

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ÉDINA CRISTIANE PEREIRA LOPES

NITROGÊNIO EM SISTEMA INTEGRADO DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA:
DINÂMICA ENTRE ESPÉCIES E ESTRATÉGIAS DE ADUBAÇÃO

CURITIBA
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ÉDINA CRISTIANE PEREIRA LOPES

NITROGÊNIO EM SISTEMA INTEGRADO DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA:
DINÂMICA ENTRE ESPÉCIES E ESTRATÉGIAS DE ADUBAÇÃO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal de Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Itacir Eloi Sandini

Co-orientadora: Prof. Dra. Claudete Reisdorfer Lang

Co-orientador: Dr. Gaetan Louiarn

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo C. de Faccio Carvalho

CURITIBA 2015

L864 Lopes, Édina Cristiane Pereira

Nitrogênio em sistema integrado de produção agropecuária :
dinâmica entre espécies e estratégias de adubação. / Édina
Cristiane Pereira Lopes. Curitiba : 2015.

97 f. il.

Orientador: Anibal de Moraes

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.

Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Produção Vegetal.

1. Pastagens - manejo. 2. Adubação - nitrogênio. I. Moraes,
Anibal de. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção
Vegetal. III. Título.

CDU 633.2.03



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL

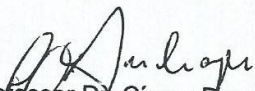


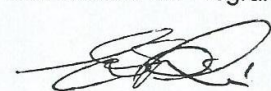
PARECER

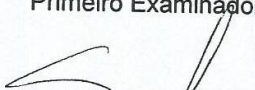
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **ÉDINA CRISTIANE PEREIRA LOPES**, sob o título **"NITROGÊNIO EM SISTEMA INTEGRADO DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA: DINÂMICA ENTRE ESPÉCIES E ESTRATÉGIAS DE ADUBAÇÃO"**, para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

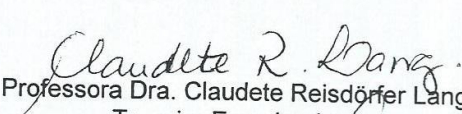
Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Tese.

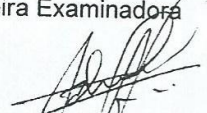
Curitiba, 21 de Setembro de 2015.

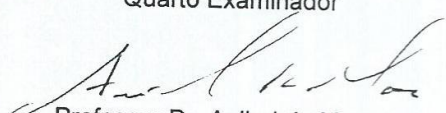

Professor Dr. Cícero Deschamps
Coordenador do Programa


Dr. Edilson Batista de Oliveira
Primeiro Examinador


Professor Dr. Sebastião Brasil Campos Lustosa
Segundo Examinador


Professora Dra. Claudete Reisdörfer Lang
Terceira Examinadora


Professor Dr. Adelino Pelissari
Quarto Examinador


Professor Dr. Anibal de Moraes
Presidente da Banca e Orientador

Dedico este trabalho aos meus pais Antonia Marez
Lopes (*In memoriam*) e Doilho Pereira Lopes.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anibal de Moraes, por me aceitar como sua orientada, pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho, orientação e, sobretudo, pelo apoio e compreensão nos momentos de difíceis que passei, demonstrando que além de ser um profissional respeitável, é também, um amigo. O mesmo sentimento de gratidão se estende à Prof. Dra. Claudete Lang.

Ao Prof. Dr. Itacir Sandini, por me co-orientar desde a implantação do experimento no campo às análises laboratoriais, estatísticas e discussões sobre sistemas integrados. Sua colaboração foi fundamental, muitíssimo obrigada.

Ao Prof. Dr. Paulo C. de Faccio Carvalho. Obrigada por me co-orientar no trabalho desenvolvido no INRA.

Agradeço especialmente ao Dr. Gaëtan Louarn, pela imensurável contribuição para esta tese, por me co-orientar na condução dos experimentos no INRA.

Agradeço à equipe de Plantas de Lavoura da UNICENTRO, pela colaboração no experimento em campo e laboratório: Alex, Fabiano, Fernando, Jackson, Jaqueline, João Daniel, Mayara, Simone, Tânia, Tatyanna, Valmiller (*in memoriam*).

À equipe do INRA de Lusignan, pela confiança em me deixar conduzir um experimento, pela convivência e pelos ensinamentos que fizeram com que eu pudesse conhecer ter uma visão real do que é uma pesquisa fora do Brasil. Abraham, Annie, Arnaud, Didieu, Ela, Eric, Isabelle, Jean-Loius, Jean-Pierre, Lina, Lorena, Marion, Nathalie, Serge, Phillip, Veronique e Vincent.

À equipe do NITA, pelo apoio, discussões e amizade, Aline, Breno, Carlos, Delma, Gilmar, Gederson, Leonardo Deiss, Leonardo Silvestri, Maurício, Marcos, Natália, Rafael e Rubia.

À Lucimara, sempre muito atenciosa.

Aos Professores Dr. Cícero Deschamps, Dr^a Cristina Mendonça e Dr^a Louise Larissa de Mio pelo incentivo e apoio.

Ao Dr. Edilson Batista de Oliveira, pelo auxílio na análise estatística e contribuições para esta tese.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para essa etapa do meu desenvolvimento intelectual e profissional, que agora, reflete também na minha pessoal.

OBRIGADA!

BIOGRAFIA DA AUTORA

Édina Cristiane Pereira Lopes nasceu em Pitanga-PR, em 30 de setembro de 1980. Filha de Doilho Pereira Lopes e Antonia Maretz Lopes (*in memoriam*).

Em 2001 se formou em Geografia pela Universidade Estadual do Centro-Oeste-UNICENTRO, em Guarapuava-PR.

Em 2002 fez Especialização em Educação, pela Universidade do Norte do Paraná-UNOPAR.

De 2003 a 2008 foi Professora da disciplina de Geografia, do Quadro Próprio do Magistério, da Secretaria de Estado de Educação – SEED-PR.

De 2004 a 2008, cursou Agronomia, na UNICENTRO, onde realizou estágio na área de Sistemas Integrados de Produção Agropecuária.

Em 2009 trabalhou como Assistente Técnica de Desenvolvimento de Produtos, da Bayer, na região de Guarapuava-PR.

De março de 2010 a fevereiro de 2011, fez Mestrado em Agronomia, área de Produção Vegetal, na UNICENTRO.

Em março de 2011 ingressou no Doutorado em Agronomia, área de Produção Vegetal, na linha de pesquisa Sistemas Integrados, na Universidade Federal do Paraná (UFPR). De fevereiro de 2013 a janeiro de 2014, realizou um período de doutorado-sanduíche no Institute National de la Recherche Agronomique (INRA), sob orientação do Dr. Gaëtan Louarn.

Em setembro de 2015, concluiu o doutorado, com apresentação da tese “NITROGÊNIO EM SISTEMA INTEGRADO DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA: DINÂMICA ENTRE ESPÉCIES E ESTRATÉGIAS DE ADUBAÇÃO”, tendo como orientador o Prof. Dr. Anibal de Moraes.

NITROGÊNIO EM SISTEMA INTEGRADO DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA: DINÂMICA ENTRE ESPÉCIES E ESTRATÉGIAS DE ADUBAÇÃO

Autora: Msc. Eng^a. Agr^a. Édina Cristiane Pereira Lopes

Orientador: Prof. Dr. Anibal de Moraes

RESUMO: O Sistema Integrado de Produção Agropecuária – SIPA pode contribuir para melhorar a eficiência de uso dos recursos disponíveis com a intensificação do uso da terra, desenvolvendo-se num sistema de produção sustentável. Para tanto, o manejo adequado do nitrogênio é indispensável, bem como, o entendimento do seu uso, considerando as diversidades dentro de um sistema. O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a dinâmica e adequação de doses de nitrogênio, em diferentes sistemas. O primeiro experimento visou avaliar estratégias de adubação nitrogenada em três épocas diferentes de aplicação: na pastagem consorciada de aveia (*Avena sativa* L.) e azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), em pré-semeadura e em cobertura no milho sob diferentes doses de nitrogênio, avaliando as características agrônômicas e o rendimento de grãos de milho (*Zea mays*, L.), em área pastejada por ovinos, num SIPA. Houve interação tripla significativa para as épocas de aplicação de N para a produtividade de grãos de milho. O segundo experimento foi realizado para comparar a dinâmica de fixação e transferência de nitrogênio em espécies leguminosas perenes, alfafa (*Medicago sativa* L.) e trevo-branco (*Trifolium repens* L.) consorciadas às gramíneas festuca alta (*Festuca arundinacea* Shreb.) e azevém (*Lolium perene* L.). Utilizaram-se dois métodos de avaliação: o método da diferença e o método isotópico com traçador ¹⁵N. Houve diferenças significativas entre as leguminosas quanto à capacidade de transferência de nitrogênio. A alfafa acumulou maior quantidade de biomassa e fixou mais nitrogênio, porém, transferiu menores quantidades deste. O trevo-branco teve uma maior proporção de raízes finas, com uma baixa relação C/N e teor de lignina, resultando numa rápida liberação de nitrogênio.

Palavras-chave: manejo de pastagens, sustentabilidade, sistemas integrados; produção vegetal.

NITROGEN FERTILIZATION STRATEGIES IN CORN IN INTEGRATED CROP-LIVESTOCK SYSTEM

Author: MSc. Eng. Agr^a. Édina Cristiane Pereira Lopes

Advisor: Prof. Dr. Anibal de Moraes

SUMMARY: Integrated Crop-Livestock System - ICLS can contribute to improve the efficiency of the use of available resources with the intensification of land use, developing a production system. Thus, the proper management of nitrogen is essential, as well the understanding of its use, considering the diversity within a system. The aim of this study was to evaluate the dynamics and adjustment of nitrogen in different systems. The first experiment aimed to evaluate the nitrogen fertilization strategies in three different times of application: in consortium oat (*Avena sativa* L.) and ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and coverage in corn (*Zea mays* L.) under different nitrogen levels, evaluating the agronomic characteristics and yield of grains of corn in area grazed by sheep, in an ICLS. There was a significant triple interaction for N application timing for the productivity of corn kernels. The second experiment was conducted to compare the dynamics of fixation and transfer of nitrogen in perennial legume species, alfalfa (*Medicago sativa* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) consortium to tall fescue grasses (*Festuca arundinacea* Shreb.) and ryegrass (*Lolium perenne* L.). They used two valuation methods: the method of difference and the isotopic tracer method with ¹⁵N. There were significant differences between the pulses as the nitrogen transfer capability. Alfalfa accumulated higher amount of biomass and fixed more nitrogen, however, transferred smaller amounts of this. The white clover had a higher proportion of fine roots, with a low C/N ratio and lignin content, resulting in a fast release nitrogen.

Keywords: pasture management, sustainability, integrated systems; vegetable production.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Os Sistemas Integrados de Produção Agropecuária em perspectiva	12
2.2. Estratégias de uso do nitrogênio na cultura do milho.....	15
2.3. O nitrogênio na agricultura e a importância para a produtividade das plantas.....	16
2.4. Estudo do fracionamento isotópico de nitrogênio aplicado à gramíneas e leguminosas.....	18
2.4.1. Técnicas isotópicas de ^{15}N e método abundância natural de ^{15}N	21
2.4.2. Fracionamento isotópico de ^{15}N	21
2.5. Referências bibliográficas	25
3. CAPÍTULO 2 – ESTRATÉGIAS DE ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO EM SISTEMA INTEGRADO DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA	33
3.1. Introdução.....	34
3.2. Material e Métodos.....	36
3.3. Resultados e Discussão.....	38
3.4. Conclusões.....	44
3.5. Referências bibliográficas	44
4. CAPÍTULO 3 - The amounts and dynamics of nitrogen transfer to grasses differ in alfalfa and white clover-based grass-legume mixtures as a result of rooting strategies and rhizodeposit quality	59
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
6. ANEXOS	78
ANEXO 1 - Resumo da análise de variância indicando os fatores de variação, graus de liberdade (GL), quadrados médios e significância (F) para as variáveis avaliadas na cultura do milho. Guarapuava, PR, 2012.....	79
ANEXO 2 – Análises de regressão referentes as características agronômicas: Número de plantas; Número de espigas por planta; Altura de planta; Grãos ardidos; Altura de inserção da espiga; Área foliar; Índice de área foliar.	80
ANEXO 3 – Análises de regressão referentes às interações dos fatores Inverno, Pré-semeadura e Verão. Figuras “A” 0 kg ha ⁻¹ N em Pré-semeadura; Figuras “B” com 75 0 kg ha ⁻¹ N em Pré-semeadura.....	87

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de produção agrícola, em seus diferentes formatos, surgem como alternativa viável para conciliar o aumento da demanda na expansão da produção global de alimentos com a urgente necessidade de uma agricultura sustentável.

Assim, a associação entre lavouras e pastagens, no contexto de produção integrada de produção animal e vegetal, constituem-se em novo paradigma na agropecuária, fazendo com que a pesquisa necessite ser executada com interdisciplinaridade e em múltiplas escalas no tempo e no espaço, em todos os componentes do sistema solo-planta-atmosfera. Esse fato se deve às diferentes possibilidades de ocupação do solo, de tipos de pastagens e de culturas, que permitem alcançar níveis elevados de produtividade e mitigar os impactos ambientais negativos, ligados à intensificação da agricultura.

Isto ocorre em razão das pastagens, sobretudo quando pastejadas, permitirem melhor ciclagem de nutrientes, o que reduz os fluxos de perda para a atmosfera e para a hidrosfera, além de incrementar a biodiversidade vegetal, animal e microbiana, que participam na dinâmica da matéria orgânica e mantém a qualidade do solo. Além de seus efeitos positivos diretos sobre o ambiente e a biodiversidade, as pastagens têm seus efeitos indiretos em diminuir os impactos ambientais negativos ligados à intensificação das culturas anuais com as quais estão associadas. Dentre esses efeitos estão a redução de fertilizantes minerais e de risco de poluição associado ao controle das plantas daninhas e a redução do uso de herbicidas, ao controle de pragas e doenças e à redução do uso de inseticidas e fungicidas (LEMAIRE et al., 2015).

Existe ainda, certa resistência ao uso da tecnologia, especialmente por parte de produtores de grãos, entendendo que o animal, no sistema, reduz a produtividade de grãos devido à compactação do solo, à remoção de nutrientes e a diminuição da cobertura vegetal e matéria orgânica no solo (CARVALHO et al., 2005). Contudo, recentemente Moraes et al., (2013) demonstraram uma tendência oposta. Em estudos realizados nas regiões subtropicais brasileiras, a produção de grãos de culturas cultivadas em sucessão ou rotação com pastagens são mais elevados em comparação com as culturas não pastejadas, demonstrando que o pastejo afeta positivamente a produção de grãos (JANSSEN, 2009; SARTOR et al., 2012; BALBINOT JUNIOR et al., 2012; SILVA et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012). Desse modo, é possível afirmar que, para um mesmo nível de intensificação, os impactos ambientais dos sistemas integrados de produção agropecuária, pelas interações espaciais e temporais entre as pastagens e as culturas anuais, sejam menores.

Surge então, a necessidade de aprimorar os conhecimentos em relação às dinâmicas e consequências das relações entre os fatores bióticos e abióticos abrangidos no sistema integrado de produção agropecuária, considerando as peculiaridades de cada ambiente, interpretando-os de forma conjunta. Observando, no entanto, que são sistemas complexos, devido às inúmeras interações espaço-temporais que provocam alterações constantes nas características e nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo.

Por isso, a compreensão e o manejo dos processos em sistemas integrados de produção agropecuária são um desafio, pois se busca o conhecimento dos benefícios na fertilidade do solo, adubando no sistema, a qual consequentemente refletirá na produtividade de pastagens e grãos.

Neste contexto, este trabalho aborda a adubação nitrogenada considerando a capacidade do solo em produzir enquanto mantém ou incrementa seu papel nas demais funções ecossistêmicas, seja na cultura do milho em sistema integrado de produção agropecuária, quanto em pastagens leguminosas consorciadas com gramíneas.

Tem-se como objetivo geral avaliar como a dinâmica e adequação de doses de nitrogênio, em diferentes sistemas.

E como objetivos específicos, desta pesquisa, são:

- a) Avaliar como as estratégias de adubação nitrogenada quanto às épocas de aplicação e diferentes doses, bem como o uso do nitrogênio podem afetar as características agrônômicas e o rendimento de grãos de milho, em área pastajeda por ovinos, num sistema integrado de produção agropecuária.
- b) Avaliar a dinâmica de transferência de N entre leguminosas perenes, bem como as a identificação das características responsáveis pelas variações na fixação e transferência de N.

2. CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Os Sistemas Integrados de Produção Agropecuária em perspectiva

Integração Lavoura-Pecuária (ILP) é a denominação coloquial dos Sistemas Integrados de Produção Agropecuária (SIPA), e refere-se a sistemas de produção que planejam associações de cultivos agrícolas e produção animal com vistas a explorar sinergismos e propriedades emergentes decorrentes deste conceito de produção (CARVALHO et al., 2014).

A integração da agricultura com a pecuária, como atividade voltada à produção de alimentos, remete aos primórdios da civilização humana no período Neolítico (CARVALHO et al., 2007). Apesar de não ser novidade, o sistema integrado de produção agropecuária está em voga, pois se faz o uso desse sistema sob os pilares da agricultura conservacionista. O plantio direto e sua exigência em cobertura do solo, aliado à diversidade de rotações mais o efeito do pastejo, interagem de forma sinérgica aportando, ao SIPA, novas propriedades.

O resultado final, em nível de sistema, é maior que a soma das contribuições das tecnologias individuais; um sinergismo que resulta em benefícios econômicos e ambientais, produção de alimentos seguros e sustentabilidade na produção. Nesse sentido, a percepção vigente é a de se tratar de raro sistema de produção, onde o dilema produção versus conservação tem solução compatível com as atuais demandas da sociedade (ANGHINONI et al., 2011).

O governo brasileiro reconhece o potencial do SIPA, quanto à capacidade de conciliar a intensificação com sustentabilidade e se comprometeu em reduzir entre 36,1 e 38,9% as emissões nacionais de CO₂-equivalente até 2020. Uma das iniciativas nesse sentido é o fomento à adoção do SIPA no Brasil, cuja contribuição estimada na redução de CO₂-equivalente estaria entre 18 a 22 milhões de toneladas pelo comprometimento em incrementar pelo menos quatro milhões de hectares as áreas operando neste tipo de sistema (ANGHINONI et al., 2011).

Há estimativas de que os sistemas integrados estejam presentes em 2,5 bilhões de ha e sejam responsáveis por metade da produção global de alimentos (HERRERO et al., 2010; BELL e MOORE, 2012). A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) reconhece o potencial dos sistemas integrados como via sustentável para se atingir objetivo de alimentar nove bilhões de pessoas em 2050. Segundo a FAO (2010), esses sistemas são capazes de incrementar a resiliência ambiental pelo aumento da diversidade biológica e pela

efetiva e eficiente ciclagem de nutrientes, que acarreta melhoria da qualidade do solo, além de prover serviços ecossistêmicos e contribuir para a adaptação e mitigação às mudanças climáticas.

A FAO (2010) também enumera como benefícios a melhoria dos processos de produção, incluindo o aproveitamento de mão de obra, a resiliência a fatores econômicos e a diminuição do risco. E sob perspectiva sociocultural, ressalta-se que os sistemas integrados permitem, aos produtores, atingir aspirações sociais e almejar dinâmica social equânime (particularmente para mulheres e jovens), promovendo segurança alimentar enquanto sejam sistemas que se ajustam aos anseios atuais dos consumidores quanto à qualidade dos produtos e dos processos de produção.

Em face às diferentes condições climáticas, econômicas e sociais de cada região, complexas combinações podem ser desenvolvidas de acordo com a natureza dos componentes, os objetivos da produção e as culturas agrícolas envolvidas, bem como de acordo com as escalas espaciais nas quais a integração ocorre (CARVALHO et al., 2010; SALTON et al., 2014).

O que se tem buscado neste sistema de produção é conciliar a máxima produtividade animal e de grãos dentro de um mesmo ano. Para tanto, é necessário utilizar culturas adaptadas à região, que favoreçam a produção integrada e que sejam economicamente viáveis. Na região subtropical do Brasil, foram adotaram técnicas como rotação de culturas anuais de verão (milho, soja, feijão) e de inverno (trigo, aveia, azevém) em plantio direto, o que qualificou o SIPA como uma alternativa de otimização da área (CARVALHO et al., 2007), embora os dados da CONAB (2012) apresentem cerca de 8,8 dos 13,3 milhões de hectares disponíveis para uso permaneceram em pousio ou subutilizados no período hibernar.

Durante a estação fria na região sul do Brasil, os estabelecimentos agrícolas geralmente utilizam gramíneas de clima temperado como fonte de alimento na criação ruminantes ou para manejo de cobertura do solo, destacando-se entre essas espécies o azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e aveia (*Avena sativa* L.) (OLIVEIRA et al., 2014).

A aveia proporciona alta produção de massa seca e qualidade da forragem, resistência ao pisoteio e baixo custo de produção (MACARI et al., 2006). A aveia proporciona precocidade e o azevém qualidade, prolongando o período de utilização. As aveias proporcionam pastejo mais cedo, porém com término nos meses de agosto/setembro. O azevém, embora mais lento na sua formação, permite utilização mais prolongada em relação às aveias, com pastejo até outubro/novembro. Com base nestas características, a utilização das

misturas de espécies forrageiras possibilita um maior tempo de utilização das pastagens, uma vez que os picos de produção de massa seca são obtidos em épocas distintas para as diferentes espécies forrageiras utilizadas (SANDINI, 2009).

Já no verão, de acordo com Alvarenga et al., (2006) a cultura do milho (*Zea mays* L.) se destaca no contexto de SIPA devido às inúmeras aplicações que esse cereal possui, quer seja na alimentação humana ou animal.

Na região Centro-Sul do Paraná, a cultura do milho é semeada, preferencialmente, em setembro/outubro com colheita em fevereiro/março. O milho sendo uma gramínea possui relação C/N superior às leguminosas, sendo 112:1 para palhada de milho e 32:1 para palhada de feijão, por exemplo (KIEHL, 1985). Dessa forma, sua palhada possui uma velocidade de decomposição mais lenta, permanecendo sobre a superfície do solo por um período mais longo, protegendo este das condições ambientais, como a erosão hídrica, que ocasiona redução da sua capacidade produtiva.

O sucesso da produção vegetal e animal no SIPA são dependentes do manejo adequado da fertilização do solo (FLORES et al., 2008), melhoramento genético vegetal e animal, bem como, a quantificação da carga animal ajustada à pastagem que antecede a lavoura. Segundo Carvalho et al., (2005) alta carga animal e, conseqüentemente, pastagem com baixa massa de forragem, é um dos principais entraves ao sucesso do SIPA. Para tanto, o manejo adequado da fertilização das pastagens é essencial.

Moraes et al., (2012) relatam que são escassos os trabalhos focando a adubação do sistema, bem como a conceituação desta forma de adubação. De forma geral, são necessárias mais pesquisas voltadas a ambientes onde existam a presença de plantas herbáceas, arbóreas e animais.

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes exigidos em maior quantidade pelo milho, as doses, épocas e métodos de aplicação dos fertilizantes nitrogenados nesta cultura são amplamente estudados em sistemas exclusivamente agrícolas, sobretudo em sistema de semeadura direta, sendo poucos os estudos em SIPA. Como os fertilizantes nitrogenados apresentam elevado custo, são necessárias estratégias que possibilitem uma melhor eficiência da utilização do N. Assim, o milho como cultura sucessora a pastagem ocupada por ovinos de corte, tendo a aplicação de N no inverno, poderia proporcionar alta produtividade animal e vegetal, bem como a adição de resteva com alta relação C/N possibilitaria a manutenção do sistema integrado a médio e longo prazo.

2.2. Estratégias de uso do nitrogênio na cultura do milho

O N é o nutriente que proporciona os maiores efeitos nos componentes do rendimento e na produtividade do milho, influenciando diversas características do crescimento e desenvolvimento (COBUCCI, 1991). Assim, uma das principais ferramentas no manejo da lavoura para obter altas produtividades é o uso de elevadas doses de fertilizantes nitrogenados. Porém, apenas uma parte do N mineral aplicado é absorvido pelas plantas. O restante é perdido do sistema solo-planta-atmosfera por processos de lixiviação, volatilização, erosão e desnitrificação, tendo ainda uma fração que permanece no solo na forma orgânica (VARGAS, 2010).

A natureza complexa das transformações do N no solo pode provocar assincronia entre a disponibilidade do nutriente no solo e a demanda pelas culturas. Dessa forma, a aplicação de N via fertilizantes minerais proporciona eficiência global em torno de 50 %, sendo o restante perdido ou imobilizado temporariamente na biomassa microbiana do solo (BAYER e FONTOURA, 2006).

A ureia é o fertilizante nitrogenado mais usado no Brasil por apresentar boa combinação entre eficiência agrônômica e preço em relação aos demais adubos nitrogenados (ERNANI, 2008). No entanto, o uso de ureia como fonte de N pode ocasionar elevadas perdas do nutriente, principalmente se aplicada em cobertura sem incorporação. A permanência dos resíduos culturais na superfície do solo no sistema de plantio direto pode promover uma barreira para o contato do fertilizante com o solo, promovendo perdas de N por volatilização de amônia (BAYER e FONTOURA, 2006).

O milho, no sistema plantio direto, frequentemente é cultivado após cereais de inverno. Durante a decomposição de resíduos culturais, pode ocorrer imobilização de nitrogênio e limitação do desenvolvimento da cultura. Para obter rendimentos elevados de milho, é necessário aplicar fertilizante nitrogenado, pois os solos, em geral, não suprem a demanda da cultura em termos de N nos diversos estádios de desenvolvimento da planta. A época de aplicação de N pode variar, sendo comum a aplicação, na semeadura, de parte do N recomendado, e o restante em cobertura, quando as plantas apresentam de 4 a 8 folhas (ESCOSTEGUY et al., 1997).

A aplicação de N em uma única época (em pré-semeadura ou na semeadura) pode resultar em acúmulo de N-NO_3^- no solo nos estádios iniciais de desenvolvimento de milho (BASSO e CERETTA, 2000), pois a demanda total da planta é pequena na fase inicial de desenvolvimento. Já no período usual de aplicação de N em cobertura (4 a 8 folhas) a

absorção de N pelas plantas é mais intensa. A aplicação, antes ou no momento da semeadura, de todo o N recomendado para a cultura de milho, tem como principal objetivo aumentar a disponibilidade de N nos estádios iniciais de desenvolvimento da cultura e, assim, reduzir o efeito da imobilização de N pelos microrganismos do solo ao decomporem resíduos culturais de alta relação C/N.

A eficiência da aplicação de N previamente à semeadura do milho foi estudada por diversos autores (SÁ, 1996; DA ROS et al., 1999; PAULETTI e COSTA, 2000; CERETTA et al., 2002). Todos verificaram pouca diferença entre as épocas de aplicação de N. No trabalho realizado por Pöttker e Wiethölter (2004), os autores observaram que a aplicação de N em pré-semeadura proporcionou rendimento de milho estatisticamente semelhante às aplicações efetuadas na semeadura e em cobertura.

Embora muitas pesquisas procurassem avaliar a necessidade ou não da adubação nitrogenada na cultura do milho em sequencia da pastagem adubada, pouco se concluiu sobre as reais condições químicas do solo após o ciclo da pastagem e a influencia dessas condições sobre a cultura seguinte, sobretudo, em uma área de SIPA. Por estes fatos, torna-se interessante a avaliação do uso do nitrogênio em diferentes épocas de aplicação, objetivando o rendimento de milho, bem como a dinâmica do nitrogênio em pastagens.

2.3. O nitrogênio na agricultura e a importância para a produtividade das plantas

O nitrogênio (N) é o componente mais abundante na atmosfera, encontrando-se numa forma combinada (N_2) que as plantas não são capazes de utilizar. Nos sistemas terrestres, é o elemento químico mais limitante para o crescimento vegetal, segundo Vitousek e Farrington (1997). As plantas requerem nitrogênio em quantidade superior a qualquer outro nutriente mineral, e a disponibilidade deste nutriente geralmente limita a produtividade das plantas em muitos ecossistemas naturais e agrícolas (EPSTEIM e BLOOM, 2005).

O N é um dos principais bioelementos, constituindo os aminoácidos e ácidos nucleicos e outras moléculas de plantas. Em particular, as leguminosas forrageiras têm um elevado teor de proteínas (14-29 % em alfafa) (MAURIES, 2003). As leguminosas foram usadas em rotações ou associadas a gramíneas na agricultura tradicional, desde os tempos antigos, por causa de sua capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico. No entanto, a disponibilidade de N sintético relativamente barato no mundo industrializado durante o século XX levou a uma diminuição da sua utilização. Na verdade, o uso excessivo de fertilizantes resultaram em uma

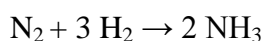
"cascata de N", ou seja, vazamentos de nitrogênio para o meio ambiente, causando diversos efeitos adversos sobre os ecossistemas e a saúde humana (SUTTON e VAN GRINSVEN, 2011).

Atualmente, a reintrodução de leguminosas e o uso da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) como uma fonte de N parece ser uma ferramenta que pode ajudar a reduzir o custo de produção e também a preservar o ambiente.

A disponibilidade de N é depois de deficiência hídrica e as condições climáticas, o principal fator limitante do crescimento das plantas. O fornecimento suficiente de N é de suma importância para o metabolismo da planta, e a adição de N aumenta a eficiência da fotossíntese (SUTTON e VAN GRINSVEN, 2011). Em sistemas agrícolas, em parte do sistema solo-planta, o N é acumulado na safra e removidos na colheita. Por conseguinte, quantidades consideráveis de N necessitam serem fornecidas para atingir o rendimento máximo (LEA e MOROT-GAUDRY, 2001).

As principais fontes de N reativo na agricultura são fertilizantes sintéticos, FBN e adubo orgânico (estrupe animal). Em termos quantitativos, fertilizantes sintéticos produzidos por meio do processo de Haber-Bosch é a forma mais consumida de N. No ano 2000, cerca de 100 megatonelas de fertilizantes industriais foram utilizados no mundo. Na verdade, o uso de fertilizantes sintéticos é grande responsável pelo aumento da produção agrícola mundial, que ocorreu durante o século 20. Estercos de gado são também uma importante fonte de N para a agricultura. Estima-se que 140 milhões de toneladas de N foram produzidos no mundo no ano 2000 (SUTTON e VAN GRINSVEN, 2011).

A fixação biológica de nitrogênio é a terceira fonte de N mais utilizada na agricultura. A FBN foi recentemente estimada em torno de 40-60 megatonelas de N por ano no mundo (SUTTON e VAN GRINSVEN, 2011). A fixação biológica de nitrogênio é um processo natural de redução de diazoto molecular (N_2) em amônia (NH_3), realizada por uma série de espécies de bactérias chamadas diazotrofos, graças à sua enzima nitrogenase, que catalisa a reação:



Assim, o N_2 , é convertido para uma forma que pode ser utilizada por sistemas biológicos (LEA e MOROT-GAUDRY, 2001). Os organismos fixadores de N_2 abrangem formas de vida livre, associações simbióticas com plantas, autótrofos e heterótrofos. Diazotrofos simbióticos incluem uma série de gêneros da *Rhizobiaceae* (por exemplo

Sinorhizobium, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*), que formam simbioses com as leguminosas. O *Rhizobium* provoca sobre as raízes do hospedeiro (leguminosa) a formação de nódulos, que são órgãos especializados os quais contêm as bactérias fixadoras de N_2 . Essa interação simbiótica é altamente específica. Um determinado rizóbio só forma nódulos em um número restrito de espécies. A fixação simbiótica de N_2 em leguminosas é responsável por grandes contribuições da fixação de N em sistemas de cultivo. Particularmente, as leguminosas forrageiras são responsáveis por uma fixação em um intervalo de 50-250 kg N ha^{-1} por ano (UNKOVICH et al., 2008), com um valor médio de 180 kg N ha^{-1} para alfafa (LOUARN et al., 2010).

2.4. Estudo do fracionamento isotópico de nitrogênio aplicado à gramíneas e leguminosas

Os estudos sobre composição isotópica de nitrogênio em solo e planta são importantes para identificar diferenças nos processos de ciclagem biogeoquímica deste elemento em ecossistemas. De acordo com Ceretta e Girotto (2011) uma das grandes dúvidas em relação à adubação nitrogenada é quanto realmente as plantas absorvem de fontes minerais ou orgânicas de N. Esse problema pode ser solucionado com o uso da técnica isotópica de N marcado, que utiliza isótopos estáveis de N (^{15}N) como traçador, cujo fluxo de passagem e os sítios de residência podem ser identificados.

Os isótopos são formas do mesmo elemento químico que diferem no número de neutrons. À medida que pertencem ao mesmo elemento, que tem o mesmo número de protons (número atômico Z). O número de neutrons (N) afeta o número total de núcleos que determina o número de massa ($A=Z+N$). O número de massa identifica cada isótopo. Alguns isótopos são radioativos, eles têm um núcleo instável que se desintegra emitindo radiação espontaneamente, enquanto outros, chamados de isótopos estáveis, não são objeto de decadência e não são radioativos.

Os isótopos nitrogênio-14, nitrogênio-15 e nitrogênio-16 são três isótopos do elemento nitrogênio com massa atômica 14, 15 e 16, respectivamente. ^{14}N e ^{15}N são isótopos estáveis de nitrogênio, enquanto o resto são radioativos. O ^{14}N mais leve, é naturalmente, muito mais abundante do que ^{15}N constituindo 99,63% do nitrogênio natural (Figura 1).

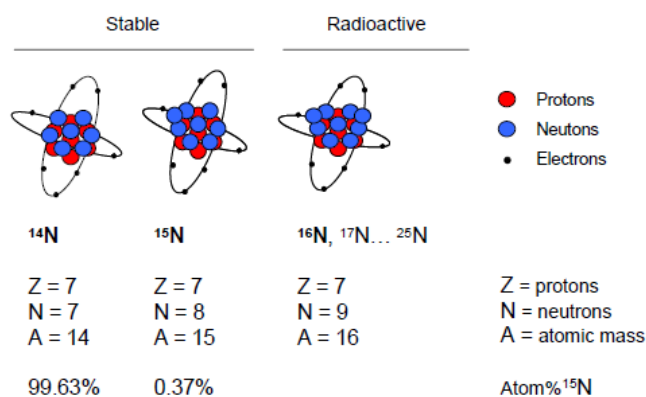


Figura 1. Os isótopos de nitrogênio.

Entradas de N são necessárias para substituir o N perdido ou removido, a fim de manter a produtividade em sistemas agrícolas. Os principais métodos de quantificação podem ser classificados em métodos diretos ou indiretos sobre as abordagens de medição de fixação de N_2 .

Os métodos diretos (incorporação de $^{15}\text{N}_2$, ensaio de redução de acetileno e método evolução de hidrogênio) fornecem uma medida direta da atividade da nitrogenase e, portanto, as taxas instantâneas de fixações de N_2 absolutas. No entanto, elas não podem ser usadas no campo para obter a quantidade de N_2 fixada ao longo de um ano. A maioria dos métodos indiretos se baseiam na separação de N na planta para a fração feita a partir do solo e a fração derivada da atmosfera e requerem a utilização de plantas não fixadoras de N como controle. Isto implica na limitação de seleção de plantas com uma taxa de absorção de N semelhante a de leguminosas, que é dada principalmente pelo seu enraizamento, morfologia e profundidade.

A diferença de N-total do sistema solo-planta é um método indireto que se baseia na medição da diferença de N total entre plantas fixadoras de N e plantas não-fixadoras de N. Isto porque as diferenças entre teores de N são geralmente pequenas e precisam serem medidas ao longo de vários anos para uma quantificação precisa. Finalmente, técnicas isotópicas de ^{15}N baseiam-se no fato de que as diferentes fontes de N para uma leguminosa (do solo e do ar) exibem diferentes abundâncias isotópicas. Isso torna possível calcular a fixação de N_2 , comparando a composição de ^{15}N de uma planta fixadora de N_2 , com uma planta não- fixadora de N_2 (que só usa o N do solo) e uma planta fixadora de N mas sem fornecimento de N no solo (SHEARER e KOHL, 1986; UNKOVICH et al, 2008) (Figura 2).

$$\% Ndfa = \left(\frac{\delta^{15}N_{soil} - \delta^{15}N_{legume}}{\delta^{15}N_{soil} - \delta^{15}N_{2,atm}} \right) * 100 \quad \quad \% Ndfa = \left(\frac{\delta^{15}N_{reference} - \delta^{15}N_{legume}}{\delta^{15}N_{reference} - B} \right) * 100$$

$$\begin{aligned} \delta^{15}N_{soil} &\rightarrow \delta^{15}N_{reference \text{ non-fixing plant}} \\ \delta^{15}N_{2, atm} &\rightarrow B = \delta^{15}N_{shoots \text{ of a legume growing without N.}} \end{aligned}$$

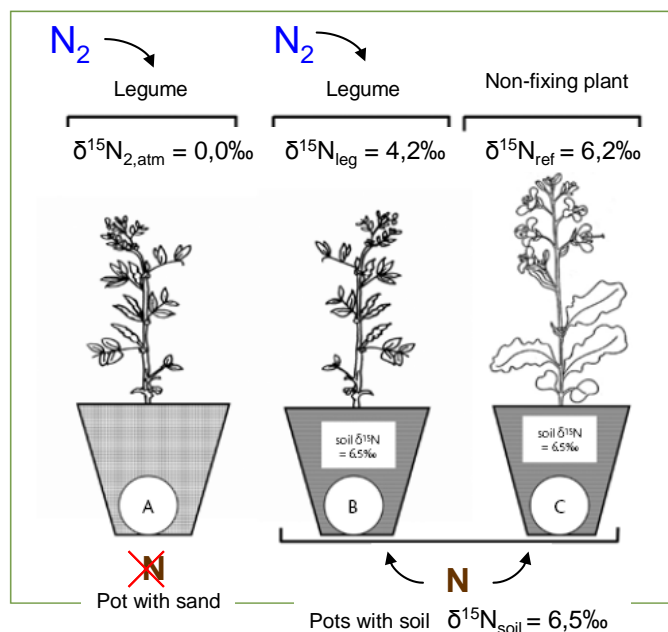


Figura 2. Cálculo de Ndfa % (porcentagem de plantas com N derivado N_2 atmosférico). Conforme a Figura 2, três indivíduos são necessários para o cálculo de Ndfa %. Uma associação entre leguminosa e *Rhizobium* que utiliza uma combinação de N do solo e N_2 atmosférico terá uma composição ^{15}N situada entre o N do solo e o N do ar. A contribuição proporcional da FBN para fixação do N em leguminosa pode ser calculada a partir da abundância de ^{15}N da leguminosa, isso se as abundâncias de ^{15}N de solo disponíveis para as plantas e N_2 atmosférico sejam conhecidos. Na prática, a composição de ^{15}N de plantas de referência é utilizada em vez da abundância de ^{15}N do *pool* de N no solo. Da mesma forma, $\delta^{15}N$ de N_2 atmosférico é substituído pelo $\delta^{15}N$ de uma leguminosa nodulada crescendo em um meio livre de N mineral, tão completamente dependentes de fixação de N_2 . Plantas de referência refletem bem a composição isotópica do solo, como eles parecem não discriminar entre ^{14}N e ^{15}N durante a assimilação do N mineral. O uso de plantas de referência é conveniente, por várias razões: (1) a composição do $\delta^{15}N$ do N total do solo é dominado por formas estáveis de N e não é um guia confiável para $\delta^{15}N$ da planta com N mineral disponível (principalmente NO_3^- e NH_4^+), (2) a abundância do solo é tecnicamente mais difícil de medir (3) representam as variações temporais $\delta^{15}N$, bem como fracionamento isotópicos dentro transformações do solo. Por outro lado, plantas de referência devem ser totalmente dependentes de N mineral do solo, usando os mesmos *pools* de N do solo nas concentrações de ^{15}N idênticos (crescendo no mesmo local) e ter profundidade de enraizamento semelhante, padrão de absorção de N e crescimento como a planta fixadora de N_2 .

2.4.1. Técnicas isotópicas de ^{15}N e método abundância natural de ^{15}N .

A ocorrência natural do isótopo menor (^{15}N) em relação ao total de isótopos de longa duração do elemento (^{15}N) dada em unidades de Atom% ^{15}N ou $\delta^{15}\text{N}$ é chamada de abundância isotópica de ^{15}N ou abundância natural de ^{15}N .

As composições de isótopos estáveis de materiais naturais são usados como traçadores para a compreensão dos pontos de origem de um elemento em um processo ou em um ciclo no ambiente (FRY, 2006). Quanto aos estudos de fixação de N_2 , os isótopos de N servem para identificar a fonte de N na planta: o N_2 fixa a partir da atmosfera ou N é assimilado a partir do solo.

Técnicas isotópicas de quantificação da fixação de N_2 (^{15}N), baseiam-se no princípio de que, se as concentrações de ^{15}N da planta, o N disponível do solo e N_2 atmosférico são conhecidos a composição ^{15}N da planta é medida, sendo assim, é possível calcular a percentagem de N derivado da atmosfera (% Ndfa) da planta N (Figura 4). De um modo geral, o N mineral do solo é ligeiramente enriquecido em ^{15}N em comparação com o ambiente, no entanto esta diferença é muito pequena.

O método de diluição isotópica de ^{15}N consiste em enriquecer o solo artificialmente pela adição de fertilizantes marcados com ^{15}N para fazer esta diferença maior. O método da abundância natural de ^{15}N usa diretamente a diferença natural que ocorre entre o solo e as concentrações de ^{15}N atmosfera para distinguir a origem do N da leguminosa (BERGENSEN e TURNER, 1983; SHEARER e KOHL, 1986).

A principal limitação do método abundância natural ^{15}N é que a diferença de abundância de ^{15}N de plantas fixadoras de N_2 e plantas de referência não fixadoras de N_2 é muito pequena, normalmente inferior a 10 ‰. Essa diferença tem um impacto direto sobre as estimativas Ndfa % (Figura 4): quanto maior a diferença, maior será a precisão do Ndfa %. Se a diferença é < 2 ‰, o método ^{15}N não pode ser utilizado. Em particular, a variabilidade de ^{15}N de dois parâmetros deve ser menor do que a diferença entre eles.

2.4.2. Fracionamento isotópico de ^{15}N

O fracionamento isotópico é um fenômeno onde as concentrações isotópicas dos reagentes e produtos difere progressivamente como uma transformação ocorre devido às ligeiramente diferentes propriedades físicas dos isótopos. Devido às suas grandes massas,

isótopos mais pesados tendem a ter taxas mais baixas de difusão e baixas constantes de equilíbrio para uma reação. Os isótopos podem apresentar um comportamento químico quase idêntico sobre as propriedades químicas, uma vez que estes são determinados pela estrutura eletrônica, e os isótopos podem compartilhar o número de prótons e elétrons. O fator de fracionamento isotópico β expressa a magnitude do efeito isotópico cinético.

Discriminação isotópica entre ^{14}N e ^{15}N está envolvida em transformações dentro do ciclo N. Estes problemas conduzem a pequenas variações $\delta^{15}\text{N}$, cuja magnitude é importante no contexto do método $\delta^{15}\text{N}$. Particularmente, a variabilidade da abundância de ^{15}N dos brotos da leguminosa (valor B) tem impacto sobre a precisão nas estimativas de % Ndfa. O valor B parece mudar em função de espécies de leguminosas e potencialmente com estirpes de rizóbios (STEELE et al., 1983.). Assim um novo valor "B" deve ser calculado para cada associação leguminosa-rizóbio. Além disso, dado o declínio progressivo da abundância de ^{15}N na parte aérea (UNKOVICH et al., 1994) (Figura 3), as leguminosas devem ser colhidas no mesmo estágio de crescimento para calcular o valor "B", que nada mais é que a abundância isotópica de ^{15}N dos órgãos acima do solo de uma leguminosa de crescimento completamente dependente de fixação de N_2 .

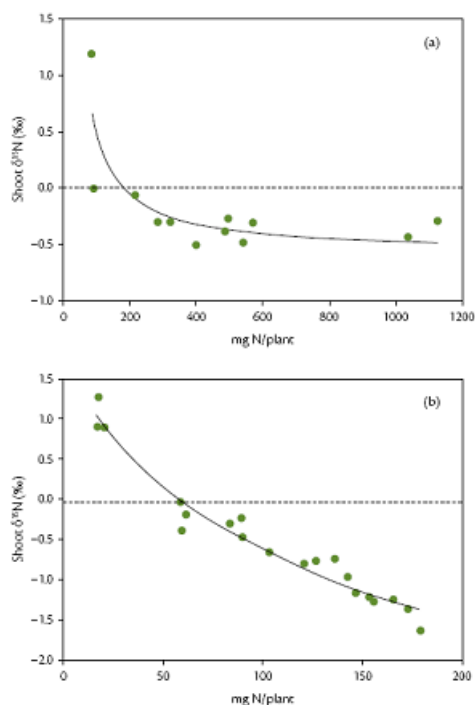


Figura 3. Mudanças dinâmicas na abundância de $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea de plantas sem fornecimento de N do solo (B) durante crescimento em (a) fava e (b) de grão de bico (UNKOVICH et. al., 1994.).

Além disso, quase todas as transformações do solo envolvem fracionamento isotópico em um ponto diferente. A nitrificação e desnitrificação são de grande importância com fatores isotópicos de fracionamento de $\beta = 1,035$ e $1,02$, respectivamente (MARIOTTI et al., 1982).

O primeiro passo do processo de nitrificação (NH_4^+ a NO_2^-) leva o ^{15}N do NO_3^- empobrecido. Da mesma forma, as emissões de N_2O e de N_2 durante a desnitrificação são esgotadas em ^{15}N , o que resulta no enriquecimento de NO_3^- no solo. Como ^{15}N de derivados de N no solo é medida em planta não fixadora de N_2 , após o N foi assimilado, esses processos podem ser considerados como já realizados. Discriminações isotópicas também ocorrem *in vivo* durante a assimilação, bactérias fixadoras de N_2 e metabolismo e transporte de N. A principal forma de N inorgânico assimilado pelas raízes das plantas é o nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). O nitrato é transportado para o cloroplasto, onde é reduzida em nitrato redutase - redutase de nitrito de amoníaco. Amônio assimilado por bactérias simbióticas é transportado para dentro das células hospedeiras por transportadoras. Nos cloroplastos, de amoníaco a partir de diferentes origens é substrato da sintetase de glutamina e glutamina - 2 - oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (EVANS, 2001).

Em plantas superiores, o fracionamento isotópico associado com redução de NO_3^- geralmente não é expresso, porque todo o NO_3^- tomado pela planta é assimilado e pode ser considerado como nula ($\beta = 1,00025$). O N_2 fixado mostra um pequeno efeito isótopo ($\beta = 1,009$ para *Medicago sativa* L.) (KYEI-BOAHEN et al., 2002). Quanto as transformações metabólicas internas, as principais discriminações isotópicas têm sido observadas durante a reação GOGAT, que produz glutamato empobrecido em ^{15}N , deixando também glutaminas enriquecidas com ^{15}N , a principal fonte primária de aminoácidos (WERNER e SCHMIDT, 2002). Discriminações também foram relatadas em reações de transaminação, tornando aminoácidos geralmente enriquecidos com ^{15}N (HARE et al., 1991) e em biossíntese de clorofila, originário de plantas C3 esgotadas em ^{15}N (CHIKARAISHI et al., 2005).

Fracionamentos isotópicos *in vivo* podem traduzir em diferenças de $\delta^{15}\text{N}$ entre os órgãos da planta. Apesar da quantidade de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas inteiras é normalmente próximo do $\delta^{15}\text{N}$ do N_2 atmosférico (0 ‰), o $\delta^{15}\text{N}$ dos nódulos é muitas vezes positiva (TJEPKEMA et al., 2000). Caules e raízes são os mais empobrecidos (SHEARER e KOHL, 1986) porque, na prática apenas a parte aérea é colhida e analisada, a $\delta^{15}\text{N}$ da parte aérea de leguminosas, que são totalmente dependentes de fixação do N_2 , chamado valor B, este é usado em vez do $\delta^{15}\text{N}$ do ar em cálculos de % Ndfa. Usando B garante que os tecidos amostrados de plantas fixadoras de N_2 e plantas de referência desviar em $\delta^{15}\text{N}$ a partir da planta inteira com a

mesma intensidade. Para não tomar em conta o fracionamento dentro do legume conduz a estimativas mais elevadas de Ndfa% e o impacto torna-se importante quanto maior for a % Ndfa (BODDEY et al., 2000).

$$atom\% ^{15}N = \left(\frac{^{15}N}{^{14}N + ^{15}N} \right) * 100$$

$$\delta^{15}N(\text{‰}) = \left(\frac{atom\% ^{15}N - 0.3663}{0.3663} \right) * 1000$$

Figura 4. As unidades de abundância isotópica. A abundância de isótopos estáveis de N são expressos em termos de % de átomos ^{15}N ou $\delta^{15}N$. Átomo % ^{15}N é a percentagem do isótopo ^{15}N menor em relação ao total de N. A unidade $\delta^{15}N$ é frequentemente utilizada para ilustrar a diferença em abundância ^{15}N entre um composto e um padrão em partes por mil. A composição atmosférica N_2 (AIR- N_2) é o maior *pool* de N no meio ambiente (4% do nitrogênio total terra) e é o padrão de referência internacional para medições de isótopos de nitrogênio. Assim, os valores de $\delta^{15}N$ descrevem o desvio de uma amostra em relação à composição isotópica de N_2 atmosférico, com um átomo de $^{15}N\%$ de 0,3663%. Padrões isotópicos é atribuído o valor 0; $\delta^{15}N$ de N_2 atmosférico é de 0 ‰.

Os órgãos de uma planta suportam uma grande variação no teor de N. Estudar a composição isotópica dos órgãos (^{15}N), é determinante para saber a sua concentração de N, bem como a natureza das biomoléculas contendo N presentes neles. Uma vez que se conforma principalmente, proteínas estruturais e enzimáticas, um elevado teor de N é normalmente associado com os tecidos metabolicamente ativos, tais como meristemas e células fotossintéticos. Folhas ativas requerem quantidades consideráveis de proteínas, enzimas e pigmentos. Em contraste, os tecidos do caule estruturais têm pouco conteúdo de proteínas e, por conseguinte, uma baixa % de N (LEA e MOROT-GAUDRY, 2001) .

Por outro lado, a % N na planta também muda durante o crescimento, diminuindo com a colheita da biomassa (LEMAIRE e GASTAL, 1997). Isto acontece devido ao aumento de proporção tecidos do caule (diminuição da relação folha/colmo), bem como a uma diminuição em % de N na fração de haste. Notavelmente, o $\delta^{15}N$ da parte aérea de leguminosas, dependendo de fixação do N_2 para o crescimento diminui com o N acumulado, mostrando um padrão semelhante ao da curva de diluição % N durante o desenvolvimento (Figura 5). Isto poderia sugerir que a diferença de $\delta^{15}N$ com o crescimento da planta também pode ser explicada como uma função do taxa de tecido (por exemplo, relação folha/colmo).

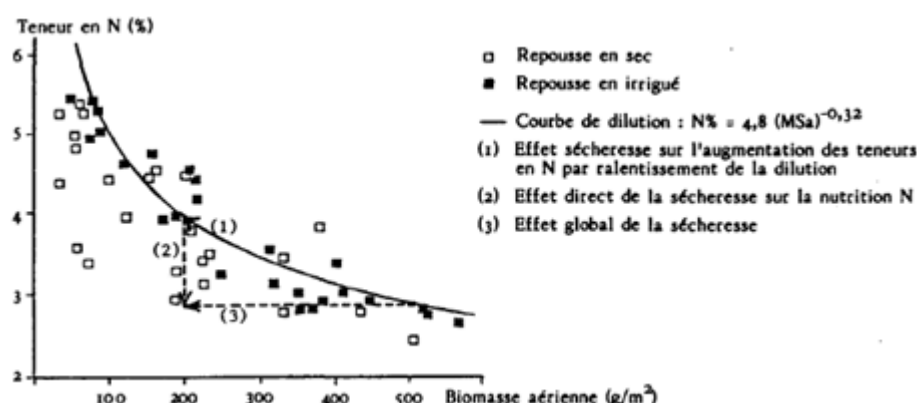


Figura 5. Mudanças no conteúdo de N de alfafa em função do acúmulo de matéria seca acima do solo durante a rebrota em condições irrigadas ou de sequeiro. (LEMAIRE e ALLIRAND, 1993).

Dada a importância à nutrição das plantas, bem como, no caso do Brasil, a dependência de importações, a sua capacidade de armazenar no solo como N total muito mais que N mineral, faz com que o N seja um elemento que se constituirá sempre no objeto de muitas pesquisas no Brasil e em outros países, como a França. Em SIPA ou em diferentes sistemas de produção usuais, o uso eficiente do N visando à produção de alimentos e a qualidade do ambiente é o que responde à sustentabilidade.

2.5. Referências bibliográficas

ALVARENGA, R.C. et al. **A cultura do milho na integração lavoura-pecuária.** (Circular Técnica n.80). Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14p.

ANGHINONI, I; MORAES, A.; CARVALHO, P.C.F.; SOUZA, E.D.; CONTE, O.; LANG, C.R. Benefícios da integração lavoura-pecuária sobre a fertilidade do solo em sistema plantio direto. **In:** Fertilidade do solo e nutrição de plantas no sistema plantio direto. ASSOCIAÇÃO DOS ENGENHEIROS AGRÔNOMOS DOS CAMPOS GERAIS. Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, 2011.

BALBINOT JUNIOR., A. A., VEIGA, M., VOGTH, G. A., SPAGNOLLO, E. Atributos de solo e produtividade de feijão após diferentes formas de uso do solo no inverno, no quinto ano de experimentação. **Ciência Rural.** 42, 401–406, 2012.

BASSO, C. J.; CERETTA, C. A. Manejo do nitrogênio no milho em sucessão a plantas de cobertura de solo, sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.24, n.4, p.905-915, 2000.

BAYER C., FONTOURA S.M.V. Dinâmica do nitrogênio no solo, pré-culturas e o manejo da adubação nitrogenada na cultura do milho em plantio direto. **In:** Fontoura SMV, Bayer C, editores. Manejo e fertilidade de solos em plantio direto. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária. 2006.

BELL, L. W.; MOORE, A. D. Integrated crop-livestock systems in Australian agriculture: Trends, drivers and implications. *Agricultural Systems*, v. 111, p. 1-12, 2012.

BERGERSEN, F. and G. TURNER. An evaluation of ^{15}N methods for estimation nitrogen fixation in a subterranean clover-perennial ryegrass sward. **Australian Journal of Agricultural Research** 34(4): 391-401. 1983.

BODDEY, R.M., PEOPLES, M.B., PALMER, B.; DART, P.J. Use of the ^{15}N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, 57, 235-270. 2000.

CARVALHO, P. C. DE F.; ANGHINONI, I.; MORAES, A.; TREIN, C. R.; FLORES, J. P. C.L; CEPIK, C. T.C.; LEVIEN, R.; LOPES, M. T.; BAGGIO, C.; LANG, C. R; SULC, R. M.; PELISSARI, A. O estado da arte em integração lavoura-pecuária. **In:** GOTTSCHALL, C.S.; SILVA, J.L.S.; RODRIGUES, N.C. (Org.). Produção animal: mitos, pesquisa e adoção de tecnologia. Canoas-RS, p.7-44, 2005.

CARVALHO P, C. de F. et al.; MANEJO DA ERVILHACA COMUM (*Vicia sativa* L.) PARA CULTIVO DO MILHO EM SUCESSÃO, SOB ADUBAÇÃO NITROGENADA. **Revista Scientia Agraria**, V. 8, nº 2, p.179-184, 2007.

CARVALHO P, C. de F. ANGHINONI, I., MORAES, A., SOUZA, E.D., SULC, R.M., FONTANELI, R.S., BAYER, C. Managing grazing animals to achieve nutrient cycling and soil improvement in no-till integrated systems. **Nutr. Cycl. Agroecosystems**, 88, 259–273. 2010.

CARVALHO, P. C. F ; MORAES, A; PONTES, L. S; ANGHINONI, I; SULC, R. M; BATELLO, C. Definições e terminologias para Sistema Integrado de Produção Agropecuária. **Revista Ciência Agronômica** (UFC. Online), v. 45, p. 1040-1046, 2014.

CERETTA, C. A. et al. Manejo da adubação nitrogenada na sucessão aveia preta/milho, no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, n.1, p.163-171, 2002.

CERETTA, J.C.; GIROTTO, E. Contexto para definir manejo de nitrogênio no sistema plantio direto. **In:** Fertilidade do solo e nutrição de plantas no sistema plantio direto. ASSOCIAÇÃO DOS ENGENHEIROS AGRÔNOMOS DOS CAMPOS GERAIS. Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, 2011.

COBUCCI, T. **Efeitos de doses e épocas de aplicação em cobertura do adubo nitrogenado no consórcio milho-feijão**. Tese. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 1991.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2010/2011 – Quarto Levantamento – Janeiro/2011. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_08_41_56_boletim_graos_4o_lev_safra_2010_2011.pdf>. Acesso em 26 de janeiro de 2012.

CHIKARAISHI, Y., MATSUMOTO, K., OGAWA, N.O., SUGA, H., KITAZATO, H., OHKOUCHI, N. Hydrogen, carbon and nitrogen isotopic fractionations during chlorophyll biosynthesis in C3 higher plants. **Phytochemistry**, 66, 911-920. 2005.

DA ROS, C.O. et al. Produtividade de milho com diferentes estratégias de adubação nitrogenada no sistema plantio direto. In: SEMINÁRIO INTERINSTITUCIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO & II MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 4., 1999, Cruz Alta. **Anais...** Cruz Alta : UNICRUZ, 1999. CD-ROM.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. 2. ed. Sunderland: **Sinouer Associates**, 2005.

ERNANI, PR. **Química do solo e disponibilidade de nutrientes**. Lages: O Autor; 2008.

ESCOSTEGUY, P.A.V.; RIZZARDI, M.A.; ARGENTA, G. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em duas épocas de semeadura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.21, n.1, p.71-77, 1997.

EVANS, R.D. Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. **Trends Plant Sci.**, 6, 3, 121-126. 2001.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **An internacional consulation on integrated crop-livestock systems for development**: The way forward for sustainable production intensification. Vol. 13-2010. Rome, 2010.

FLORES, J.P.C. **Atributos físicos e químicos do solo e rendimento de soja sob integração lavoura-pecuária em sistemas de manejo**. Tese de Doutorado em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008. 114p.

FRY, B. Stable Isotope Ecology. **Springer**, Berlin. 2006.

HARE, P.E., FOGEL, M.L., STAFFORD JR., T.W., MITCHELL, A.D. AND HOERING, T.C. The isotopic composition for carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. **Journal of Archaeological Science**, 18, 277-292. 1991.

HERRERO, M. et al. Smart investments in sustainable food production: revisiting mixed crop-livestock systems. **Science**, v. 327, p. 822-825, 2010.

JANSSEN, H. P., 2009. **Adubação nitrogenada para rendimento de milho silagem em sucessão ao azevém pastejado, pré-secado e cobertura em sistemas integrados de produção.** (TESE). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2009.

KIEHL, J. E. **Fertilizantes orgânicos.** São Paulo: Ed. Ceres, 1985. 492 p.

KYEI-BOAHEN, S., SLINKARD, A.E. AND WALLEY, F.L. Isotopic fractionation during N₂ fixation by chickpea. **Soil Biology & Biochemistry**, 34, 417-420. 2002.

LEA, P.J. AND MOROT-GAUDRY, J.F. Nitrogen, Plant Growth and Crop Yield, Nodule Formation and Function. In Plant Nitrogen. **Springer-Verlag Berlin**, INRA Paris. pp. 343-367; 101-146. 2001.

LEMAIRE, G. AND ALLIRAND, J.M. Relation entre croissance et qualité de la luzerne : interaction génotype-mode d'exploitation. **Fourrages**, 134, 183-198. 1993.

LEMAIRE, G. AND GASTAL, F. N Uptake and Distribution in Plant Canopies. In Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops. **Springer-Verlag Berlin**. pp. 3-43. 1997.

LEMAIRE, G. **Integração soja-bovinos de corte no sul do Brasil. Grupo de pesquisa em sistema integrado de produção agropecuária.** Boletim Técnico, 2 ed. Porto Alegre, 2015.

LOUARN, G., CORRE-HELLOU, G., FUSTEC, J., LO-PELZER, E., JULIER, B., LITRICO, I., HINSINGER, P., LECOMTE, C. Déterminants écologiques et physiologiques de la productivité et de la stabilité des associations graminées-légumineuses. **Innovations Agronomiques**, 11, 79-99. 2010.

MACARI, S. et al. Avaliação da mistura de cultivares de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) com azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) sob pastejo. **Ciência Rural**, v.36, n.3, mai-jun, p.910-915, 2006.

MARIOTTI, F., CHAMPIGNY, M.L., AMARGER, N. AND MOYSE, A. Nitrogen isotope fractionation associated with nitrate reductase activity and uptake of N by pearl millet. **Plant Physiol.**, 69, 880-884. 1982.

MAURIES, M. Luzerne : culture, récolte, conservation, utilisation. **Editions France Agricole**. 2003.

MORAES, A; CARVALHO, P.C.F; BARRO, R.S.; LUSTOSA, S.B.; LANG, C.R. Perspectivas da Pesquisa em Sistemas Integrados de Produção Agrícola e Pecuária no Brasil e os novos desafios. **Anais** da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia A produção animal no mundo em transformação Brasília – DF, 23 a 26 de Julho de 2012.

MORAES, A; CARVALHO, P.C.F; ANGHINONI, I; LUSTOSA, S.B.C; COSTA, S.V; KUNRATH. T.R. Integrated crop–livestock systems in the Brazilian subtropics. **Eur. J. Agronomy**. 2013.

OLIVEIRA, R. A. G de. et al.; Produção de biomassa de azevém consorciado ou não com ervilhaca. In XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia, 24. Universidade Federal do Espírito Santo, **Resumo**, p.2. 2014.

PAULETTI, V.; COSTA, L.C. Época de aplicação de nitrogênio no milho cultivado em sucessão à aveia preta no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.4, p.599-603, 2000.

PÖTTKER, D.; WIETHÖLTER, S. Épocas e métodos de aplicação de nitrogênio em milho cultivado no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1015-1020, jul-ago, 2004.

SÁ, J.C. de MORAES. **Manejo de nitrogênio na cultura do milho no sistema plantio direto**. Passo Fundo, RS : Aldeia Norte, 1996. 23p.

SALTON, J. C. et al. Integrated crop-livestock system in tropical Brazil: Toward a sustainable production system. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 190, p. 70-79, 2014.

SANDINI, I.E. **Milho, feijão e nitrogênio no sistema de produção integração lavoura-pecuária**. Tese (Doutorado em Agronomia). Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2009.

SARTOR, L. R., ASSMANN, A. L., ASSMANN, T. S., BIGOLIN, P. E., MIYAZAWA, M., CARVALHO, P. C. F. Effect of swine residue rates on corn, common bean, soybean and wheat yield. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 36, 661–669. 2012.

SILVA, H.A., MORAES, A., CARVALHO, P.C.F., FONSECA, A.F., DIAS, C.T.S. Maize and soybeans production in integrated system under no-tillage with different pasture combinations and animal categories. **Revista Ciência Agronômica**. 43,757–765. 2012.

SILVEIRA, E. R., PELISSARI, A., MORAES, A., PIAZZETTA, H., von, L., LANG, C.R., CARVALHO, P.C.F. Intensidade de pastejo e adubação nitrogenada na massa seca de aveia e produtividade do milho na integração lavoura-pecuária. **Semina**. 33, 1323–1332. 2012.

SHEARER, G., AND KOHL, D. H. N₂-Fixation in Field Settings: Estimations Based on Natural ¹⁵N Abundance. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13, 699-756. 1986.

STEELE, K.W., BONISH, P.M., DANIEL, R.M. AND O'HARA, G.W. Effect of Rhizobial Strain and Host Plant on Nitrogen Isotopic Fractionation in Legumes. **Plant Physiol.**, 72, 1001-1004. 1983.

SUTTON, M.A. AND VAN GRINSVEN, H. The European nitrogen problem in a global perspective, Nitrogen processes in terrestrial ecosystems. In The European Nitrogen Assessment. Cambridge: **Cambridge University Press**. pp 9-31 and 99-125. 2011.

TJEPKEMA, J.D., SCHWINTZER, C.R., BURRIS, R.H., JOHNSON, G.V. AND SILVESTER, W.B. Natural abundance of ¹⁵N in actinorhizal plants and nodules. **Plant and Soil**, 219, 285-289. 2000.

UNKOVICH, M. J., PATE, J. S., SANFORD, P. AND ARMSTRONG, E. L. Potential precision of the $\delta^{15}\text{N}$ natural abundance method in field estimates of nitrogen fixation by crop and pasture legumes in S.W. Australia. **Austral. J. of Agri. Res.**, 45, 119-132. 1994.

UNKOVICH, M., HERRIDGE, D., PEOPLES, M., CADISCH, G., BODDEY, R., GILLER, K., ALVES, B. AND CHALK, P. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. **Clarus design**, Canberra. 2008.

VITOUSEK, P.M.; FARRINGTON, H. Nutrient limitation and soil development: experimental tests of a biogeochemical theory. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 37. 1997.

VARGAS, VP. **Manejo da adubação nitrogenada na recuperação de estresses em milho**. Dissertação. Lages: Universidade do Estado de Santa Catarina; 2010.

WERNER, R.A. AND SCHMIDT, H.L. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. **Phytochemistry**, 61, 465-484. 2002.

3. CAPÍTULO 2 – ESTRATÉGIAS DE ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO EM SISTEMA INTEGRADO DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA

ÉDINA CRISTIANE PEREIRA LOPES¹, ANIBAL DE MORAES¹, CLAUDETE REISDORFER LANG¹ e ITACIR ELOI SANDINI², EDILSON BATISTA DE OLIVEIRA³

UFPR, Curitiba, PR, Brasil, edinacplopes@gmail.com, amoraes@ufpr.br, langc@ufpr.br, UNICENTRO, Guarapuava, PR, Brasil, isandini@hotmail.com, EMBRAPA, Colombo, PR, Brasil, edilson.oliveira@embrapa.br

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação doses de N em três épocas diferentes: em cobertura na pastagem de inverno; em pré-semeadura e em cobertura no milho, sobre a produtividade do milho, em um Sistema Integrado de Produção Agropecuária. O experimento foi realizado em Guarapuava-PR, em delineamento de blocos casualizados com parcelas subsubdivididas. A parcela principal consistiu dos tratamentos 0; 75; 150 e 225 kg ha⁻¹ de N, aplicadas na pastagem de *Avena sativa* L., consorciada com *Lolium multiflorum* Lam., na subparcela foram os tratamentos 0 e 75 kg ha⁻¹ de N na pastagem em pré-semeadura do milho e na subsubparcela os tratamentos 0; 75; 150; 225 e 300 kg ha⁻¹ de N na cultura do milho, correspondendo aos fatores Inverno (I), Verão (V) e Pré-semeadura (PS), respectivamente. As variáveis analisadas foram a produtividade de grãos e componentes de rendimento do milho. A produtividade foi significativa para a interação (I), (V) e (PS). A menor produtividade constatada foi de 4.176 kg ha⁻¹ de grãos, sem aplicação de N. Com 75 kg ha⁻¹ de N em pré-semeadura, a produtividade de grãos de milho foi de 7.148 kg ha⁻¹, obtendo um incremento de 71,16% em comparação à produtividade sem nenhuma aplicação nitrogenada. Com aplicação de 75 kg ha⁻¹ de N em pré-semeadura, mais 150 ou 225 kg ha⁻¹ de N no inverno, não se faz necessária à aplicação de N no verão.

Palavras-chave: Produtividade; componentes de rendimento; teor de N foliar; clorofila.

NITROGEN FERTILIZATION STRATEGIES IN CORN IN INTEGRATED CROP-LIVESTOCK SYSTEM

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the effect of applying N rates at three different times : in coverage in winter pasture ; in pre-sowing and coverage corn on corn yield in an Integrated Crop-Livestock System. The experiment was conducted in Guarapuava-PR, in a randomized block design with split plots. The main plot treatments consisted of 0; 75; 150 and 225 kg ha⁻¹ N applied in the pasture of *Avena sativa* L., intercropped with *Lolium multiflorum* Lam., in the subplot treatments were 0 and 75 kg ha⁻¹ N in the pasture in pre-sowing corn and subsubparcela treatments 0; 75; 150; 225 and 300 kg ha⁻¹ of N in corn, corresponding to factors Winter (I), Summer (V) and Pre-sowing (PS), respectively. The variables analyzed were grain yield and corn yield components. The yield was significant for the interaction (I), (V) and (PS). The lowest observed productivity was 4.176 kg ha⁻¹ of grain without the application of N with 75 kg ha⁻¹ N in pre-sowing, productivity of corn grains was 7.148 kg ha⁻¹, obtaining an increase of 71.16% compared to productivity without nitrogen application. With application of 75 kg ha⁻¹ N in pre-sowing, another 150 or 225 kg N ha⁻¹ in winter, the application of N is not necessary in the summer.

Keywords: Productivity; yield components; leaf nitrogen content; chlorophyll.

3.1. Introdução

O Sistema Integrado de Produção Agropecuária (SIPA) (Carvalho et al., 2014) é reconhecido como alternativa para intensificação sustentável (FAO, 2010), com interações positivas entre culturas e animais, promovendo ciclagem de nutrientes e melhoria do solo (Salton et al., 2014), além de proporcionar alta viabilidade econômica (Balbinot Junior et al., 2009), desde que tenha manejo adequado da adubação nitrogenada (N).

Embora a maior apreensão dos agricultores seja a ideia de que pastoreio em sucessão ou rotação com culturas agrícolas poderia comprometer o rendimento de grãos, Moraes et al., (2013) demonstraram uma tendência oposta. Em estudos realizados nas regiões subtropicais brasileiras, a produção de grãos de culturas cultivadas em sucessão ou rotação com pastagens são mais elevados em comparação com as culturas não pastejadas, demonstrando que o pastoreio afeta positivamente a produção de grãos (Janssen, 2009; Sartor et al., 2012; Balbinot

Junior et al., 2012; Silva et al., 2012; Silveira et al., 2012), sobretudo, quando o pastejo é associado ao efeito residual do N (Assmann et al., 2003; Novakowski et al., 2011).

O N, depois da água, tem sido considerado o principal fator limitante à produção de biomassa nos ecossistemas (Lemaire, 1997). Exerce importante função nos processos bioquímicos da planta, sendo constituinte de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos, fitocromos e clorofila (Taiz e Zeiger, 2009). Portanto, o suprimento inadequado deste nutriente é considerado um dos principais fatores limitantes ao rendimento de grãos do milho, pois caracteriza-se como o mais exigido em quantidade, e ainda possui recomendações de adubação complexas (Gomes et al., 2007; Fornasier Filho, 2007).

A disponibilidade de N no solo, para a cultura do milho, é controlada basicamente pela decomposição da matéria orgânica e por adubações nitrogenadas, sendo que, quando são utilizadas culturas com baixa relação C:N na matéria seca, em rotação ou sucessão, aliado ao manejo de incorporação dos restos culturais, a decomposição e a mineralização é mais rápida e a ciclagem do N ocorre em curto espaço de tempo (Pavinato et al., 2008).

Um dos aspectos mais discutidos no manejo da adubação nitrogenada na cultura de milho é a época de aplicação de N e a quantidade a ser aplicada. No que se refere à adubação antecipada (em pré-semeadura do milho) após o manejo da cultura de inverno, o N aplicado deve ser imobilizado de forma temporária pela biomassa microbiana, e, posteriormente, disponibilizada, em parte, nos estádios de maior demanda de N pelo milho. Por sua vez, o N aplicado em cobertura, promove acúmulo de teores totais de nitrogênio na camada superficial, o que modifica os processos de imobilização, mineralização, lixiviação e desnitrificação (Silva et al., 2005), principalmente em áreas onde o uso desse sistema já esteja consolidado (Gomes et al., 2007), podendo reduzir a disponibilidade de N (Sá, 1996).

Entender a melhor época de aplicação do nitrogênio quando se trabalha com sistema de produção, visando permitir a redução das doses de N aplicadas em cobertura, sem comprometimento da produtividade. Considerando tal hipótese, conduziu-se este trabalho com o objetivo de avaliar a eficiência do N e a produtividade de grãos, em função de doses crescentes aplicadas na pastagem no inverno, em pré-semeadura do milho e em cobertura na cultura do milho, em área pastejada por ovinos num Sistema Integrado de Produção Agropecuária.

3.2. Material e Métodos

O trabalho foi conduzido em um experimento de longa duração implantado em 2006, no *Campus* CEDETEG da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) no município de Guarapuava-PR. As avaliações foram realizadas na safra 2011/2012. O solo é classificado como Latossolo Bruno distroférico típico (EMBRAPA, 2006), apresentando na profundidade de 0 a 20 cm, as seguintes características químicas: pH em CaCl_2 : 4,8; matéria orgânica: $44,9 \text{ g dm}^{-3}$; fósforo (P): $3,0 \text{ mg dm}^{-3}$; potássio (K^+): $0,54 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; cálcio (Ca^{2+}): $3,02 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; magnésio (Mg^{2+}): $2,73 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; alumínio (Al^{3+}): $0,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; H+Al: $4,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; CTC: $10,38 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, V%: 60,4%.

O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cfb (Maak, 1968). A precipitação anual varia de 1400 a 1800 mm e os meses de abril e maio são os mais secos (IAPAR, 1994). Na Figura 1 observa-se o extrato do balanço hídrico de abril de 2011 a abril de 2012, sendo apresentado por decêndio.

A área experimental era cultivada com culturas anuais para produção de grãos, em semeadura direta, desde o ano de 2003. Em 2006, iniciou-se um projeto de SIPA em que, durante o período de inverno, a área experimental é ocupada por ovinos, em pastagem consorciada de aveia e azevém, e, no verão, com cultivo de milho e feijão em anos intercalados. O método de pastoreio utilizado foi o contínuo, sendo mantida uma altura de pasto de 14 cm, com a técnica do controle da altura do pasto usando lotações variáveis, *put-and-take* (Mott e Lucas, 1952).

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados em parcelas subsubdivididas, num esquema fatorial $4 \times 2 \times 5$, com três repetições. Nas parcelas principais, com 0,2 ha cada, foi isolada do pastoreio uma área de 96 m^2 , a qual constituiu a área sem pastejo, e o restante da parcela em pastejo. Somente as áreas com pastejo foram avaliadas. Nas parcelas principais foram aplicados quatro tratamentos em cobertura com doses N na forma de ureia a 45% de N, sendo: 0; 75; 150; 225 kg ha^{-1} de N aplicados na pastagem no inverno, considerado como fator Inverno (I). Nas subparcelas foi aplicado 0; 75 kg ha^{-1} de N no final do ciclo das pastagem, imediatamente após a retirada dos animais da área e 16 dias antes da semeadura do milho, sendo o fator Pré-semeadura (PS) e nas subsubparcelas aplicaram-se 0; 75; 150; 225; 300 kg ha^{-1} de N em cobertura no milho correspondendo ao fator Verão (V). A unidade experimental na subsubparcela apresentava uma área de $17,6 \text{ m}^2$ total (4 linhas x 0,8 m x 5,5 m).

A pastagem foi implantada em 30 de maio de 2011, em sistema de semeadura direta, com mistura de 40 e 60 kg ha⁻¹ de sementes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e aveia, (*Avena sativa* L.) respectivamente, com espaçamento de 0,17 m entre linhas, tendo como cultura antecessora o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Na adubação de base utilizou-se 0 kg ha⁻¹ de N, 40 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 40 kg ha⁻¹ de K₂O, sendo as respectivas fontes o super fosfato triplo e o cloreto de potássio.

Em 30 de junho, no início do perfilhamento das plantas de aveia e azevém, foi efetuada em aplicação única, a adubação nitrogenada em cobertura, correspondendo aos tratamentos de Inverno.

O pastejo dos ovinos foi iniciado no dia 08/08/2011 e finalizado no dia 17/10/2011, quando se retiraram os animais da área. Nesta data, foi estimada a quantidade de fitomassa no resíduo da pastagem e logo após foi realizada a aplicação nitrogenada, de 0 e 75 kg ha⁻¹ de N, correspondendo aos tratamentos Pré-semadura. Realizou-se, então, a dessecação da pastagem com herbicida glyphosate (900 g i.a. ha⁻¹) em 200L ha⁻¹ de calda, 15 dias antes da semeadura.

A semeadura do híbrido de milho 30F53RR foi realizada no dia 01 de novembro, em semeadura direta sem adubação nitrogenada na semeadura, ou seja, de base. A emergência das plântulas ocorreu oito dias após a semeadura. A unidade experimental constitui-se de quatro linhas de semeadura com 5 m de comprimento, sendo a área útil para avaliação de 8,8 m² (2 linhas centrais x 0,8 m x 5,5 m).

Para a adubação de verão, o fósforo e o potássio foram aplicados a lanço, antes da semeadura, nas dosagens de 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 100 kg ha⁻¹ de K₂O, sendo as fontes o super fosfato triplo (45% de P₂O₅) e cloreto de potássio (60% de K₂O), respectivamente.

O N, em conformidade com os tratamentos de Verão, foi aplicado em dose única em cobertura, em estágio V4 do milho. Sendo a fonte utilizada a ureia a 45% de N.

Efetuuou-se o controle das plantas pela aplicação de atrazina (3.500 g ha⁻¹), mais óleo mineral (0,5 L ha⁻¹), em pós-emergência. Não foi efetuado controle de pragas e doenças. O ajuste da população foi realizado por meio de desbaste das plantas, em estágio V2 de desenvolvimento, contudo, fez-se a contagem antes da colheita do número de plantas na área útil da parcela de forma a verificar se não houve morte de plantas posteriormente ao desbaste. A população média final foi estimada em 75.191 plantas ha⁻¹.

Foram determinadas a campo, o teor relativo de clorofila total (TRC) utilizando as folhas-bandeira, ou seja, a primeira abaixo da espiga, em florescimento pleno. A

determinação do teor relativo de clorofila foi realizada com medidor portátil modelo Clorofilog CFL 1030 – Falker, denominado clorofilômetro, em valores SPAD (Soil Plant Analysis Development). As leituras no medidor de clorofila, duas por folha, foram realizadas em pontos situados na metade a dois terços do comprimento da folha amostrada, a partir da base, e a dois centímetros de uma das margens da folha, utilizando 10 folhas por parcela. Após a leitura, as folhas foram arrancadas para determinação do teor de N foliar (TN), através da concentração de N-NH_4^+ , pelo método espectrofotométrica-azul-de-indofenol (EMBRAPA, 2009), em laboratório.

A produtividade grãos de milho (PG) foi determinada em área útil de 8 m^2 (2 linhas x $0,8 \times 5 \text{ m}$) e, depois da correção de umidade para 14%, o valor foi convertido para kg ha^{-1} , sendo a colheita de milho efetuada em 14/04/2012. Para avaliação do número de fileiras (FI), grãos por fileira (GF) e grãos por espiga (GE), foram utilizadas dez espigas colhidas em sequência da segunda linha central de cada parcela, que após analisadas foram incorporadas ao peso da parcela. A massa de mil grãos (MMG) foi estimada a partir da pesagem de 300 grãos.

Os dados foram submetidos à análise de variância e avaliados pelo Teste F e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Empregou-se para análise dos dados o programa estatístico SANEST. O cálculo da máxima eficiência técnica (valor de X da variável independente para o qual Y (variável dependente) é máximo) para cada variável foi realizado de acordo com metodologia descrita em Storck et al. (2000), por meio da seguinte fórmula: $X = -b_1/2b_2$. Em que: X = ponto da máxima eficiência técnica; b_1 e b_2 = coeficientes da equação.

3.3. Resultados e Discussão

Observa-se na Figura 1 que houve deficiência hídrica no final de janeiro e início de fevereiro, a qual coincidiu com o período crítico da cultura do milho, que vai do pendoamento ao início do enchimento de grãos (Matzenauer, 1994; Bergamaschi et al., 2004) em que o déficit hídrico tem maior impacto sobre o rendimento de grãos de milho quando ocorre no florescimento (Bergamaschi et al., 2006). Para este trabalho, o período de déficit hídrico não afetou o rendimento dos grãos.

Na Tabela 1, são apresentados os quadrados médios das variáveis analisadas e suas interações. Conforme pode ser verificada na mesma, houve interação entre os fatores Inverno

(I), Verão (V) e Pré-semeadura (PS), para a produtividade de grãos (PG). Para número de fileiras por espiga (FI) e número de grãos por espiga (GE) não se observou efeitos dos tratamentos e nem das interações. O número de grãos por fileira (GF) apresentou resposta positiva para os fatores Inverno (I), Verão (V) e para a interação Pré-semeadura x Inverno (PS x I). A massa de mil grãos (MMG) sofreu influência dos fatores Inverno (I), Verão (V) e da interação Pré-semeadura x Inverno (I). O teor de N na folha (TN) apresentou significância para os fatores Inverno (I), Verão (V) e Pré-semeadura (PS). Para o teor relativo de clorofila (TRC), verificou-se resposta positiva para os fatores Verão (V), Pré-semeadura (PS) e para a interação Pré-semeadura x Verão (PS x V).

Os tratamentos de inverno tiveram efeito sobre o resíduo de fitomassa seca acumulada de pastagem, apresentando resposta linear, indicando que o pasto sofreu influência da aplicação de N (Figura 2). As máximas produtividades foram de 1,784; 2,290; 2,403 e 2,517 kg ha⁻¹, para as doses 0; 75; 150 e 225 kg ha⁻¹ de N, respectivamente. Observou-se que para cada quilo de N aplicado por hectare ocorreu um ganho de 3,08 kg ha⁻¹ da fitomassa seca da pastagem. Houve, então, um incremento de 41,09% na fitomassa do pasto com a dose máxima de N aplicada em relação a não adubada. Verificou-se que, após 109 dias da aplicação de N no Inverno, este continuou a influenciar na produtividade de fitomassa seca, indicando efeito positivo da aplicação nitrogenada, pela quantidade de fitomassa seca existente.

A produtividade de grãos de milho (PG) na interação entre os fatores Inverno (I), Verão (V) e Pré-semeadura (PS), com zero de N kg ha⁻¹ em pré-semeadura é apresentada nas Figuras 3A e 3B. Observa-se na Figura 3A que houve resposta linear para a dose 0 kg ha⁻¹ de N no inverno. A menor produtividade constatada foi de 4,176 kg ha⁻¹, para esta dose. Vale salientar que toda a área do presente trabalho foi pastejada por ovinos, então, o nitrogênio foi oriundo dos excrementos dos animais. Considera-se essa média de produtividade próxima à média brasileira da safra 2011/2012 que foi de 4.799 kg ha⁻¹ (CONAB, 2012). Outro fator a considerar é a matéria orgânica, que neste trabalho foi de 44,9 g dm⁻³. Essa produtividade evidencia a elevada disponibilidade de N no solo. Bayer e Fontoura (2006) atestaram o bom potencial no rendimento de milho em um solo com alto teor de matéria orgânica, obtendo rendimento de 5 t ha⁻¹ em sucessão à aveia-preta, sem aplicação nitrogenada.

Então, quando o N não foi aplicado, ou seja, dose 0 kg ha⁻¹ de N no verão, foi observada diferença significativa. Contudo, conforme as doses de N eram aplicadas no Verão (V), as diferenças não foram significativas para a produtividade grãos de milho, frente às doses 75; 150 e 225 kg ha⁻¹ de N no Inverno (I). Isso evidencia que não houve efeito residual

do N aplicado na pastagem sobre a cultura do milho. Este resultado difere de outros autores (Assmann et al., 2003; Novakowski et al., 2011, Sandini et al., 2011). Com essas aplicações de N no inverno a produtividade foi de 7.248; 8.017 e 11.965 kg ha⁻¹ de grãos de milho, respectivamente, correspondendo a 73,56; 91,98 e 186,52% de incremento em relação à área que não recebeu fertilizante nitrogenado em nenhuma época de aplicação, que teve, então, a menor produtividade que foi de 4.176 kg ha⁻¹.

A produtividade de grãos de milho (PG) foi afetada com resposta quadrática para a interação Inverno (I), Verão (V) e Pré-semeadura (PS), como observada na Figura 3B. Constatou-se efeito das doses de N aplicadas em cobertura na cultura do milho para as doses de N aplicadas na pastagem, mostrando que, houve resposta significativa para as doses 0; 75 e 150 kg ha⁻¹ de N aplicadas no inverno, indicando que para essas doses foram necessárias aplicações nitrogenadas na cultura do milho. Com isso, as aplicações de 261; 222 e 211 kg ha⁻¹ de N verão, seriam obtidas as máximas produtividades de milho de 13.402; 13.007 e 13.311 kg ha⁻¹ de grãos de milho para as doses 0; 75; 150 kg ha⁻¹ de N no inverno, respectivamente. Respostas similares foram obtidas por Sandini et al., (2011), com a diferença de que estes autores obtiveram significância também para a dose 225 kg ha⁻¹ de N no inverno.

As parcelas que receberam 225 kg ha⁻¹ de N no Inverno (I) não responderam à adição de N no milho (V), em média, apresentaram elevadas produtividades de grãos de milho (12.338 kg ha⁻¹), comprovando, neste caso, que grande parte do N aplicado no inverno estava disponível para o cultivo posterior e, conseqüentemente, não necessitaria de adubações nitrogenadas, conforme Assmann, et al., (2003). Tais resultados são semelhantes aos obtidos por Novakowski et al., (2011), onde os autores verificaram que com aplicação de 150 kg ha⁻¹ de N no inverno na pastagem não se teve resposta da adubação nitrogenada na cultura do milho subsequente, decorrente do fato de que grande parte do N aplicado no inverno estava disponível para o cultivo posterior e, conseqüentemente, não necessitou de adubações nitrogenadas. Silveira et al., (2012), verificaram efeito residual do N aplicado na pastagem sobre a cultura do milho em SIPA, onde este sistema possibilitou a reciclagem e disponibilização de nitrogênio sendo que o pastoreio favoreceu a ciclagem mais rápida do N, estimulando a absorção pelas plantas.

Ainda quanto à produtividade de grãos de milho (PG), a interação entre os fatores Inverno (I), Verão (V) e Pré-semeadura (PS), agora com 75 de N kg ha⁻¹ em pré-semeadura (PS), é apresentada nas Figuras 3C e 3D. Das doses de N aplicadas de verão frente às doses de inverno, foi verificada significância para a dose 0 de N kg ha⁻¹, obtendo-se resposta linear

com nível de significância de 1% (Figura 3C). Mostrou-se, então, que houve incremento na produtividade de grãos de milho com a aplicação nitrogenada em pré-semeadura (PS). Assim, com aplicação de 75 kg ha^{-1} de N em pré-semeadura (PS), com zero kg ha^{-1} de N no Inverno e no Verão, a produtividade de grãos foi de 7.148 kg ha^{-1} , obtendo um incremento de 71,16% em comparação à produtividade sem nenhuma aplicação nitrogenada, em nenhuma época, quando se obteve 4.176 kg ha^{-1} de grãos. Isto mostra que o rendimento de grãos de milho é influenciado pela disponibilidade de nitrogênio.

As diferenças não foram significativas para a produtividade grãos de milho, frente às doses 75; 150 e 225 kg ha^{-1} de N no Inverno (I), evidenciando mais uma vez, que não houve efeito residual do N aplicado na pastagem sobre a cultura do milho, nem mesmo quando houve aplicação nitrogenada em pré-semeadura. Provavelmente, a ocorrência desse fato se deve às altas e consecutivas aplicações nitrogenadas. Esses resultados concordam com o trabalho desenvolvido por Fernandes et al. (2005), que, estudando a eficiência de uso de N em cultivares de milho, utilizando doses de 0 a 180 kg ha^{-1} de N, relataram que os aproveitamentos de N decresceram com a elevação das doses aplicadas, em razão de o suprimento de nitrogênio exceder as necessidades da cultura do milho. Essa diminuição é oriunda de prováveis perdas de amônia e perdas de nitrato por lixiviação após o processo de nitrificação, que aumentam com a dose aplicada, e esse aumento pode ser linear ou exponencial.

A maior produtividade obtida foi sem a aplicação de N em pré-semeadura (PS), sem aplicação no inverno e com 300 kg ha^{-1} de N no verão (V), obtendo-se $13.406 \text{ kg ha}^{-1}$ de grãos (Figura 3A). Quando se utilizou a aplicação de 75 kg ha^{-1} de N em pré-semeadura (PS), porém, sem nitrogênio no inverno (I) e com 300 kg ha^{-1} de N no verão (V), foi constatada a produtividade de $12.771 \text{ kg ha}^{-1}$ de grãos (Figura 3C). Isso representa 4,74% a menos de incremento em produtividade de grãos. E essa diminuição no rendimento é devido ao aumento das doses de N, com as quais a eficiência do uso do nitrogênio diminuiu.

Já na Figura 3D, foi verificada significância, obtendo-se resposta linear com nível de significância de 1 e 5%, para as doses 0 e 75 kg ha^{-1} de N, respectivamente. Constatou-se os efeitos dessas doses de Verão (V) sobre as doses de Inverno (I), demonstrando que, dependendo da quantidade de N utilizado no inverno, associada à aplicação nitrogenada em pré-semeadura, faz-se necessária aplicações nitrogenadas na cultura do milho. Com exceção das doses 150 e 225 kg ha^{-1} de N no Inverno (I), as quais revelam que a utilização de 75 kg ha^{-1} de N em pré-semeadura, são válidas para não precisar realizar aplicações nitrogenadas no verão, quando utilizadas altas doses de N no inverno, correspondendo à produtividade de 11.837 e $11.913 \text{ kg ha}^{-1}$ de grãos de milho.

Quanto aos componentes de rendimento, para o número de grãos por fileira (GF) são apresentadas respostas significativas para os fatores Inverno (I), Verão (V) e para a interação Pré-semeadura x Inverno (PS x I), como se observam nas Figuras 4 A, B e C. Para o fator Inverno (I), o número de grãos apresentou resposta quadrática. O mesmo aconteceu quando o N foi aplicado em cobertura no milho (V). Para a interação Pré-semeadura x Inverno (PS x I), notou-se a comportamento quadrático e significativo para a dose 0 kg ha⁻¹ de N em Pré-semeadura sobre o Inverno, sendo não significativo quando adicionado 75 kg ha⁻¹ de N em Pré-semeadura.

A massa de mil grãos (MMG) também sofreu influência dos fatores Inverno (I), Verão (V) e da interação Pré-semeadura x Inverno (I) (Figuras 5 A, B e C). Para todos, observou-se comportamento quadrático e significativo, indicando que a massa de mil grãos (MMG) foi influenciada positivamente pela aplicação nitrogenada. Outros autores (Sangoi et al., 2007 ; Lang et al., 2011; Melo et al., 2011) descreveram o efeito pela adubação nitrogenada sobre os componentes da produção de milho, salientando que o N é fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Além de que doses mais altas de N mantêm as folhas fisiologicamente ativas por mais tempo, prolongando a duração do período de enchimento de grãos e favorecendo a produção de grãos mais pesados (Silva et al., 2005).

Os teores de N na folha (TN) apresentou significância para os fatores Inverno (I), com resposta linear, conforme o aumento da aplicação nitrogenada na pastagem. Fernandes e Buzetti (2005), Gomes et al. (2007) e Mota et al., (2015), também observaram elevação linear no teor de N das folhas em resposta ao incremento de doses de N no milho. Para o Verão (V), a resposta foi quadrática, corroborando com Melo et al. (2011). Para a Pré-semeadura (PS), não foi possível realizar o gráfico, porém, o Teste de Tukey indicou que houve diferença para as médias 39,37 e 41,2 g kg⁻¹, para as doses 0 e 75 kg ha⁻¹ de N, respectivamente. Isso indica que a aplicação nitrogenada em Pré-semeadura (PS) contribuiu para o acréscimo das concentrações de N-NH₄⁺. (Figuras 6 A e B). As médias dos teores de N foliar para o Inverno (I), Verão (V) e Pré-semeadura (PS), foram respectivamente, 40,28; 40,29 e 40,28 g kg ha⁻¹. Os resultados são semelhantes aos de Pariz et al., (2011) em que adubação nitrogenada na pastagem influenciou o teor de N foliar da cultura do milho em sucessão.

No que se referem aos teores relativos de clorofilas totais (TRC), verificou-se significância para os fatores Verão (V), Pré-semeadura (PS) e para a interação Pré-semeadura x Verão (PS x V). Pela Figura 7 A onde está representada a leitura (em unidades SPAD) da clorofila total das folhas de milho, em função das doses de N aplicado no Inverno (I)

observou-se comportamento linear para clorofila total, indicando que houve resposta ao efeito residual do nitrogênio na cultura do milho, quando aplicado na pastagem de inverno. Resultados semelhantes foram obtidos por Mota et al., (2015) que também observou incremento linear do TRC nas folhas de milho em resposta à elevação das doses.

Para a Pré-semeadura (PS), não se apresenta o gráfico, mas, o Teste de Tukey mostrou que houve diferença para as médias 54,06 e 55,16, para as doses 0 e 75 kg ha⁻¹ de N, respectivamente. Na Figura 7B, observou-se resposta quadrática para a interação Pré-semeadura (PS) x Verão (V), com aumento do teor relativo de clorofila nas folhas de milho pela aplicação de 75 kg ha⁻¹ de N em Pré-semeadura (PS), correspondendo à média de 55,2 para este tratamento e de 54,1 para a dose zero de N em Pré-semeadura (PS). Segundo Rocha et al., (2005) o teor relativo de clorofila pode ser usado como um indicador de níveis de nitrogênio na planta, além de proporcionar uma boa correlação com o rendimento de algumas culturas, como no caso a cultura do milho (Rambo et al., 2007).

Assim como observada Figura 7B, a dose de 225 kg ha⁻¹ de N no Verão (V) com 75 kg ha⁻¹ de N em Pré-semeadura (PS), apresentou o maior incremento na formação de clorofila nas folhas de milho, com 56,2 (unidades SPAD) sendo que a partir desta dose houve diminuição da formação da clorofila, indicando que a planta não respondeu a altas doses de N. O aumento do teor de clorofila observados na clorofila total (unidades SPAD) corrobora com os apresentados por Pariz et al., (2011). No entanto, o menor índice de clorofila total (49,8) verificado na ausência de aplicação de N na pastagem, foi semelhante aos verificados por Rambo et al., (2007) e Pariz et al., (2011).

Observou-se, então, que houve efeito significativo de N sobre o teor de N na folha e sobre o TRC na folha-índice. Esse efeito da aplicação nitrogenada sobre ambas indica que as quantidades de N absorvidas pela planta até o florescimento foram diferentes para as épocas de aplicação testadas no trabalho.

Fez-se a análise de correlação simples (r) entre as variáveis: teor de N foliar (TN) e teor relativo de clorofila na folha (TRC), com a produtividade de grãos de milho, pois, foram significativos para os diferentes tratamentos aplicados no Inverno (I), Pré-semeadura (PS) e Verão (V). Evidenciou-se que a produtividade de grãos (PG) correlacionou-se positivamente com os teores de clorofila total (TRC) para os fatores acima citados, apresentando $r = 0,93$; 1 e $0,93$, respectivamente. Foi apresentada também alta correlação entre a variável produtividade e N foliar: $r = 0,97$; 1 e $0,99$. As leituras do clorofilômetro referentes aos teores de clorofila total correlacionaram-se positivamente com o teor de N na folha ($r = 0,94$; 1 e

0,91), sendo superiores aos resultados obtidos por Argenta et al., (2004), os quais obtiveram correlação entre a leitura do clorofilômetro e o teor de N na folha ($r = 0,59$). Jordão et al. (2010) e Netto (2012), também constataram alta correlação entre o teor de N foliar e a leitura do índice TRC foliar medida pelo clorofilômetro. Eles atribuíram essa correlação ao fato de que mais de 50 % do N presente nas folhas faz parte das moléculas de clorofila.

Com esses resultados afirmar-se que a dinâmica do nitrogênio em uma área de SIPA, consequentemente, a eficiência de uso desse elemento pela cultura do milho, é dependente da quantidade e época de aplicação do fertilizante.

3.4. Conclusões

A pastagem de inverno adubada com 150 ou 225 kg ha⁻¹ de N, e mais 75 kg ha⁻¹ de N em pré-semeadura, não se faz necessária à aplicação de N em cobertura na cultura do milho, pois apresentou uma produtividade de 11,837 e 11,913 kg ha⁻¹ de grãos de milho, respectivamente.

Agradecimentos

Ao REUNI-CNPq pela concessão de bolsa de Doutorado à primeira autora.

Ao Projeto Redes Nacionais de Pesquisa em Agrobiodiversidade e Sustentabilidade Agropecuária-REPENSA, pelo financiamento e apoio à pesquisa.

3.5. Referências bibliográficas

ASSMANN, T. S., RONZELLI JR. P., MORAES, A., ASSMANN, A. L., KOEHLER, H. S., SANDINI, I. Rendimento de milho em área de integração lavoura-pecuária sob o sistema plantio direto, em presença e ausência de trevo branco, pastejo e nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 27, 675–683, 2003.

BALBINOT JUNIOR, A. A. *et al.* Integração lavoura-pecuária: intensificação do uso de áreas agrícolas. **Ciência Rural**. In press, 2009.

BALBINOT JUNIOR., A. A., VEIGA, M., VOGTH, G. A., SPAGNOLLO, E. Atributos de solo e produtividade de feijão após diferentes formas de uso do solo no inverno, no quinto ano de experimentação. **Ciência Rural**. 42, 401–406, 2012.

BAYER, C. FONTOURA, S.M.V. Dinâmica do nitrogênio no solo, pré-culturas e o manejo da adubação nitrogenada na cultura do milho em plantio direto. In: Fontoura SMV, Bayer C, editores. Manejo e fertilidade de solos em plantio direto. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária; 2006.

BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G.A.; BERGONCI, J.I.; BIANCHI, C.A.M.; MÜLLER, A.G.; COMIRAN, F.; HECKLER, B.M.M. Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, p.831-839, 2004.

BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G.A.; COMIRAN, F.; BERGONCI, J.I.; MÜLLER, A.G.; BIANCHI, C.A.; PEREIRA, P.G. Deficit hídrico e produtividade na cultura do milho. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.41, n.2, p.243-249, fev. 2006.

CARVALHO, P. C. F ; MORAES, A; PONTES, L. S; ANGHINONI, I; SULC, R. M; BATELLO, C. Definições e terminologias para Sistema Integrado de Produção Agropecuária. *Revista Ciência Agronômica* (UFC. Online), v. 45, p. 1040-1046, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2012. Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2012.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Humberto Gonçalves dos Santos, 2 ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2006.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2ª ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **An internacional consultation on integrated crop-livestock systems for development: The way forward for sustainable production intensification.** Vol. 13-2010. Rome, 2010.

FERNANDES, F. C. S.; BUZETTI, S.; ARF, O.; ANDRADE, J. A. C. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 2, p. 195-204, 2005.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho.** Jaboticabal: Funep, 2007. 576 p.

GOMES, R. F.; SILVA, A. G. da; ASSIS, R. L.; PIRES, F. R. Efeito de doses e época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agronômicos da cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 31, p. 931-938, 2007.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - IAPAR. **Cartas climáticas do estado do Paraná 1994.** Londrina, IAPAR, 1994. 49p.

JANSSEN, H. P., 2009. **Adubação nitrogenada para rendimento de milho silagem em sucessão ao azevém pastejado, pré-secado e cobertura em sistemas integrados de produção.** (TESE). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2009.

JORDÃO, L.T. LIMA, F.F. LIMA, R.S. OLIVEIRA, M.C.N. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária. In: **Anais da 29ª Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas [CDROM]; 2010; 17-21 set 2010; Guarapari.** Guarapari: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; 2010.

LANG, C. R. et al. Integração Lavoura-Pecuária: eficiência de uso do nitrogênio na cultura do milho. **Scientia Agraria.** V.12, n.1, p.053-060, Curitiba, 2011.

LEMAIRE, G.; GASTAL, F. **N uptake and distribution in plant canopies.** In: **Diagnosis of the nitrogen status in crops.** G. LEMAIER (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1997. Cap. 1, p 3-43.

MAAK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Curitiba: Banco de Desenvolvimento do Estado do Paraná. 1968. 350p.

MATZENAUER, R. Modelos agrometeorológicos para estimativa do rendimento de milho, em função da disponibilidade hídrica no Estado do Rio Grande do Sul. 1994. 172p. **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MELO, F. de B.; CORÁ, J. R.; MILTON, J. Fertilização nitrogenada, densidade de plantas e rendimento de milho cultivado no sistema plantio direto. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 27-31, 2011.

MORAES, A; CARVALHO, P.C.F; ANGHINONI, I; LUSTOSA, S.B.C; COSTA, S.V; KUNRATH. T.R. Integrated crop–livestock systems in the Brazilian subtropics. **Eur. J. Agronomy**. 2013.

MOTT, G.E.; LUCAS, H. L. The design, conduct en interpretation of grazing trials on cultivated and improved pastures. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 1952. **Proceedings** ... Pensylvania: State College, 1952. p.1380-1395.

MOTA, M.R. SANGOI, L. SCHENATTO, D.E. DALL'IGNA, L. Fontes estabilizadas de nitrogênio como alternativa para aumentar o rendimento de grãos e a eficiência de uso do nitrogênio pelo milho. **R. Bras. Ci. Solo**, 39:512-522, 2015.

NETTO, A.P.C. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no teor de clorofila em diferentes híbridos de milho cultivados em segunda safra. In: **Anais** do 29º Congresso Nacional de Milho e Sorgo [CD-ROM]; 2012; 26-30 ago 2012; Águas de Lindoia. Águas de Lindoia: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; 2012.

NOVAKOWISKI, J.H; SANDINI, I.E; NOVAKOWISKI, J.H; Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum* brasilense na cultura do milho. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1687-1698, 2011.

PAVINATO, P. S.; CERETTA, C. A.; GIROTTTO, E.; MOREIRA, I. C. L. Nitrogênio e potássio em milho irrigado: análise técnica e econômica da fertilização. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 358-364, 2008.

PARIZ, C.M.; ANDREOTTI, M.; MELLO, L.M.; LIMA, R.C. Produtividade de grãos de milho e massa seca de braquiárias em consórcio no sistema de integração lavoura-pecuária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, p.875-882, 2011.

RAMBO, L.; SILVA, P.R.F.; STRIEDER, M.L.; SANGOI, L.; BAYER, C.; ARGENTA, G. Monitoramento do nitrogênio na planta e no solo para predição da adubação nitrogenada em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.3, p.407-417, 2007.

SARTOR, L. R., ASSMANN, A. L., ASSMANN, T. S., BIGOLIN, P. E., MIYAZAWA, M., CARVALHO, P. C. F. Effect of swine residue rates on corn, common bean, soybean and wheatyield. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 36, 661–669. 2012.

SANDINI, I.E.; MORAES, A.; PELISSARI, A.; NEUMANN, M.; FALBO, M.K.; NOVAKOWISKI, J.H. Efeito residual do nitrogênio na cultura do milho no sistema de produção integração lavoura-pecuária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.8, p.1315-1322, ago, 2011.

SÁ, J.C.M. Reciclagem de nutrientes e parâmetros para recomendação de adubação das culturas em sistemas de produção sob plantio direto. In: CURSO SOBRE ASPECTOS BÁSICOS DE FERTILIDADE E MICROBIOLOGIA DO SOLO SOB PLANTIO DIRETO, 1., Rio Verde. 1998. Resumo de Palestras. Passo Fundo, Aldeia Norte, 1998. p.13-52.

SALTON, J. C. et al. Integrated crop-livestock system in tropical Brazil: Toward a sustainable production system. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 190, p. 70-79, 2014.

SANGOI, L.; ERNANI, P. R.; SILVA, P. R. F. da. Maize response to nitrogen fertilization timing in two tillage systems in a soil with high organic matter. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, p. 507-517, 2007.

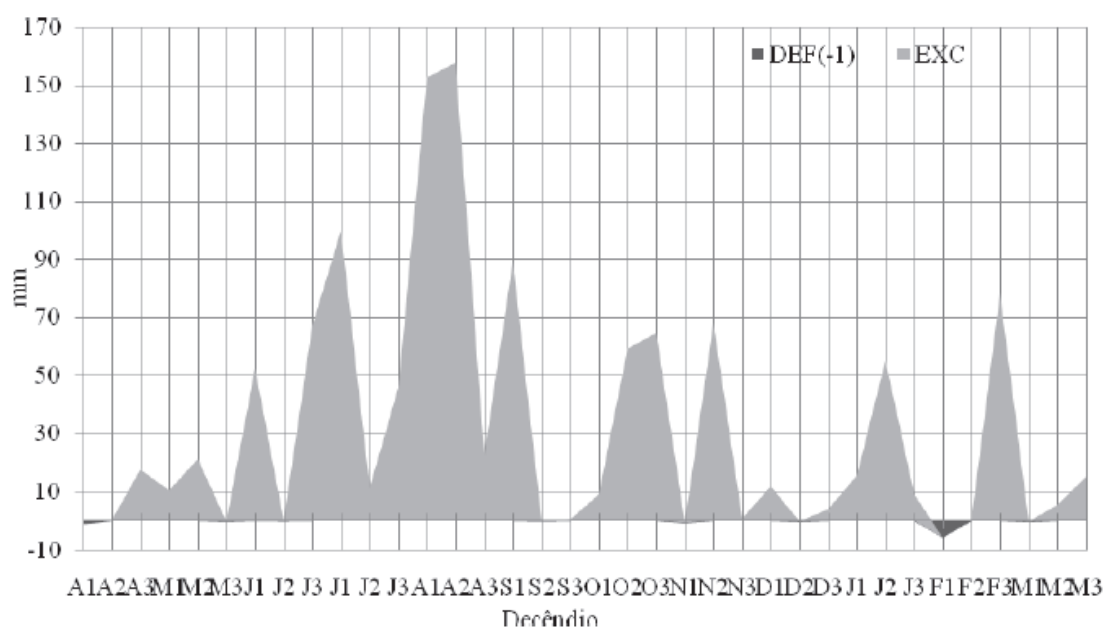
SILVA, E. C.; FERREIRA, S. M.; SILVA, G. P.; ASSIS, R. L.; GUIMARÃES, G. L. Épocas e formas de aplicação de nitrogênio no milho sob plantio direto em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 29, p. 725-733, 2005.

SILVA, H.A., MORAES, A., CARVALHO, P.C.F., FONSECA, A.F., DIAS, C.T.S. Maize and soybeans production in integrated system under no-tillage with different pasture combinations and animal categories. **Revista Ciência Agronômica**. 43,757–765. 2012.

SILVEIRA, E. R., PELISSARI, A., MORAES, A., PIAZZETTA, H., von, L., LANG, C.R., CARVALHO, P.C.F. Intensidade de pastejo e adubação nitrogenada na massa seca de aveia e produtividade do milho na integração lavoura-pecuária. **Semina**. 33, 1323–1332. 2012.

STORK, L.; GARCIA, D. C.; LOPES, S. J. Et al. Experimentação vegetal. Santa Maria: Ed. UFSM, 2000. 198p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.



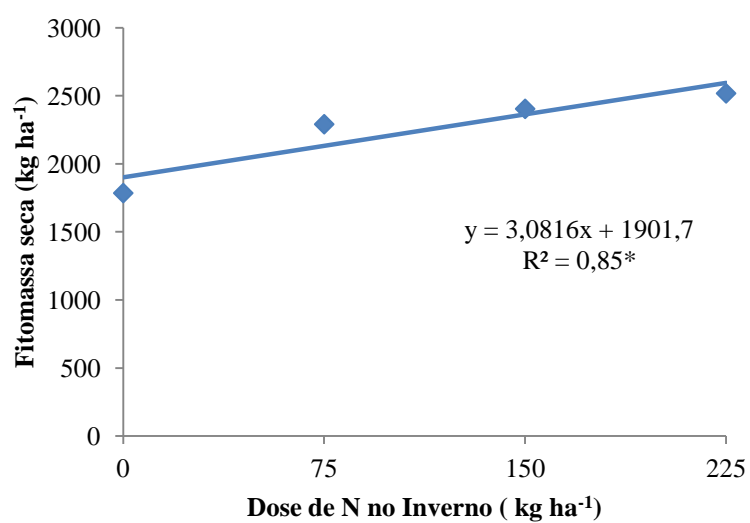


Figura 2. Fitomassa seca acumulada do resíduo de aveia branca (*Avena sativa* L.) e azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) de acordo com as doses de nitrogênio aplicadas no inverno. Guarapuava, PR, 2012.

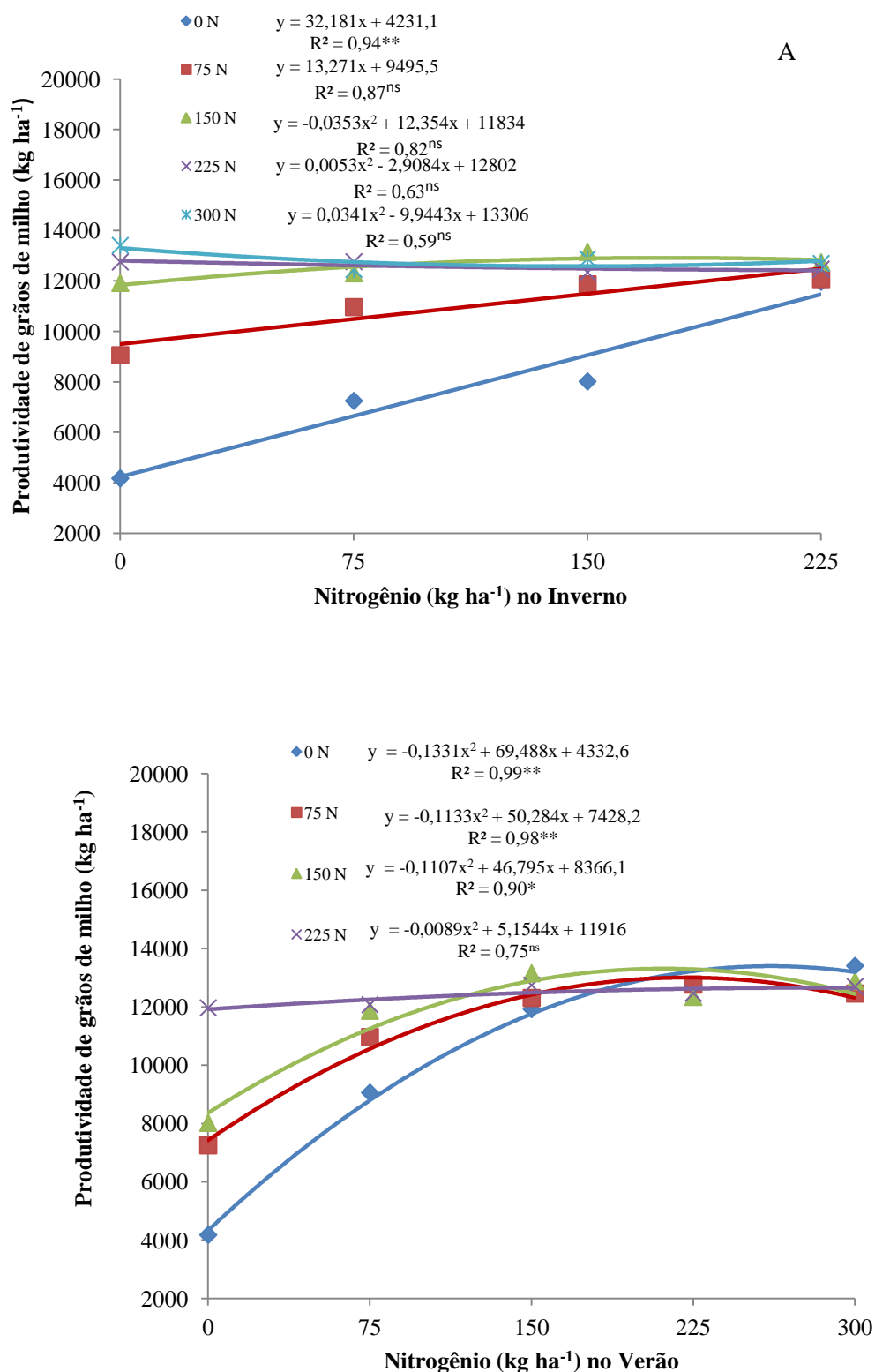


Figura 3. Produtividade de grãos de milho sob interação das doses de Inverno, Pré-semeadura e Verão, com a dose 0 kg ha^{-1} de N Pré-semeadura (A e B). Guarapuava, PR, 2012.

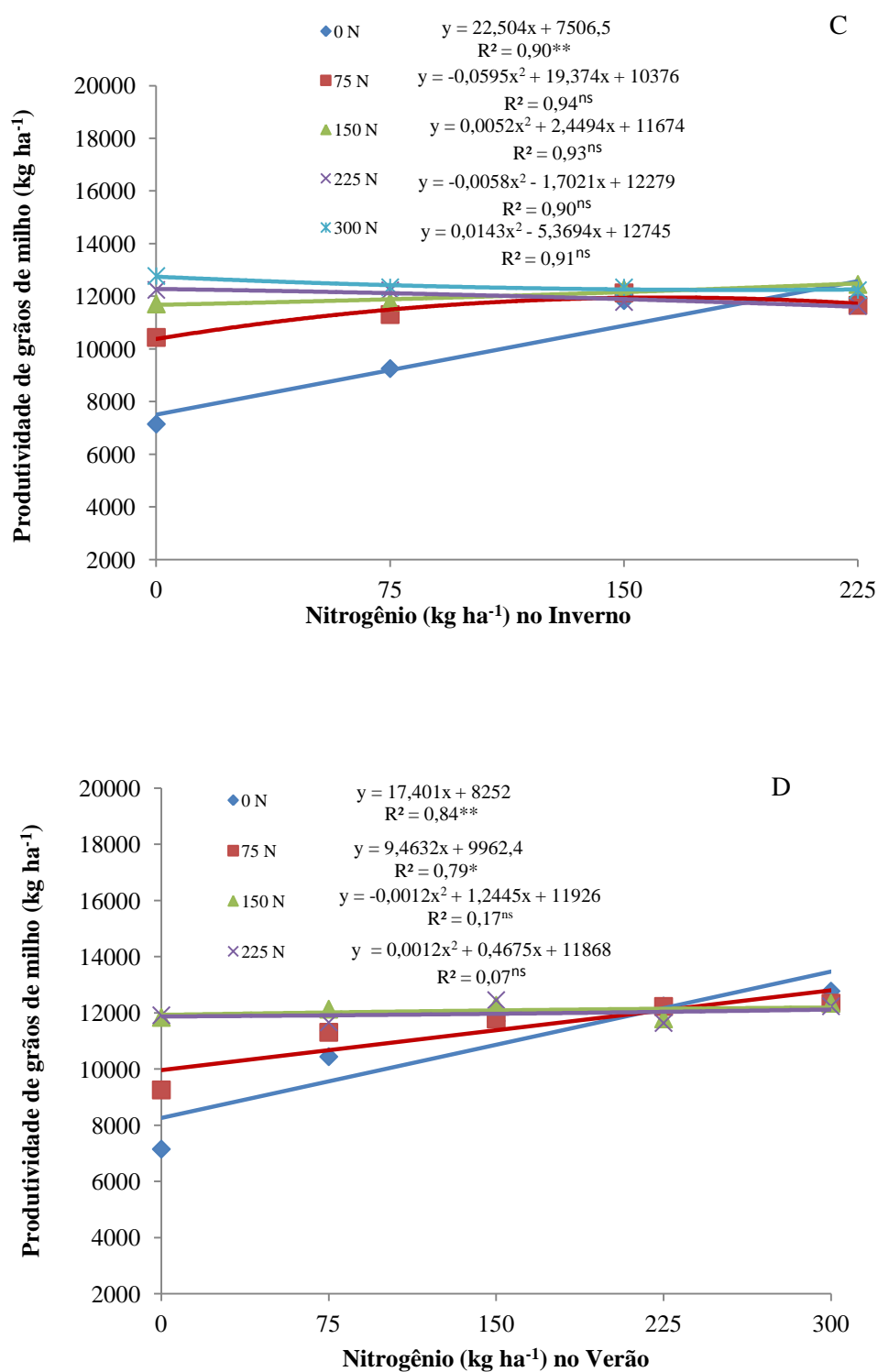


Figura 3. Produtividade de grãos de milho sob interação das doses de Inverno, Pré-semeadura e Verão, com a dose 75 kg ha^{-1} de N em Pré-semeadura (C e D). Guarapuava, PR, 2012.

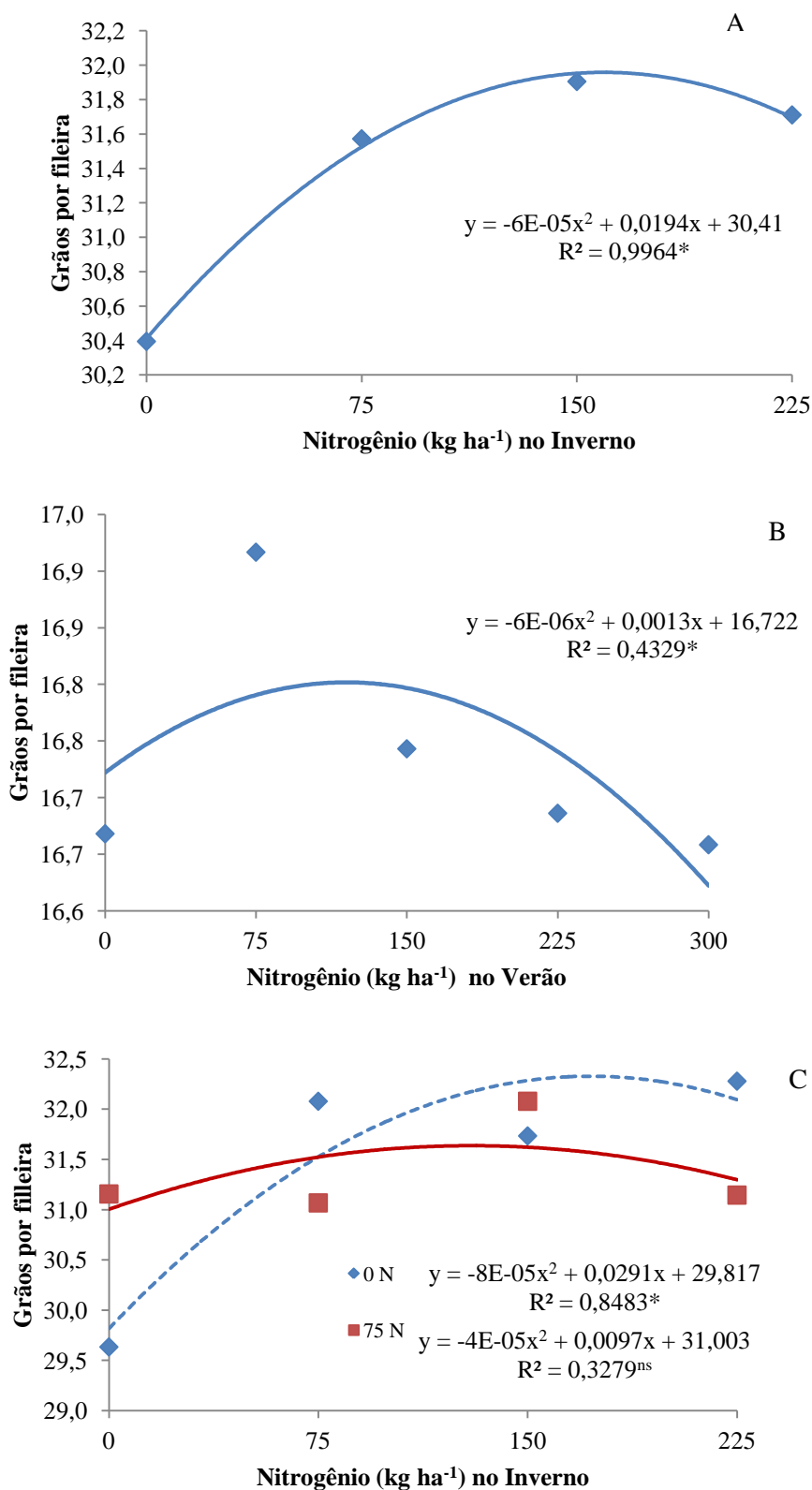


Figura 4. Número de grãos por fileira de milho sob as doses de N aplicadas no Inverno (A), no Verão (B) e sob a interação das doses das de Pré-semeadura e Verão (C). Guarapuava, PR, 2012.

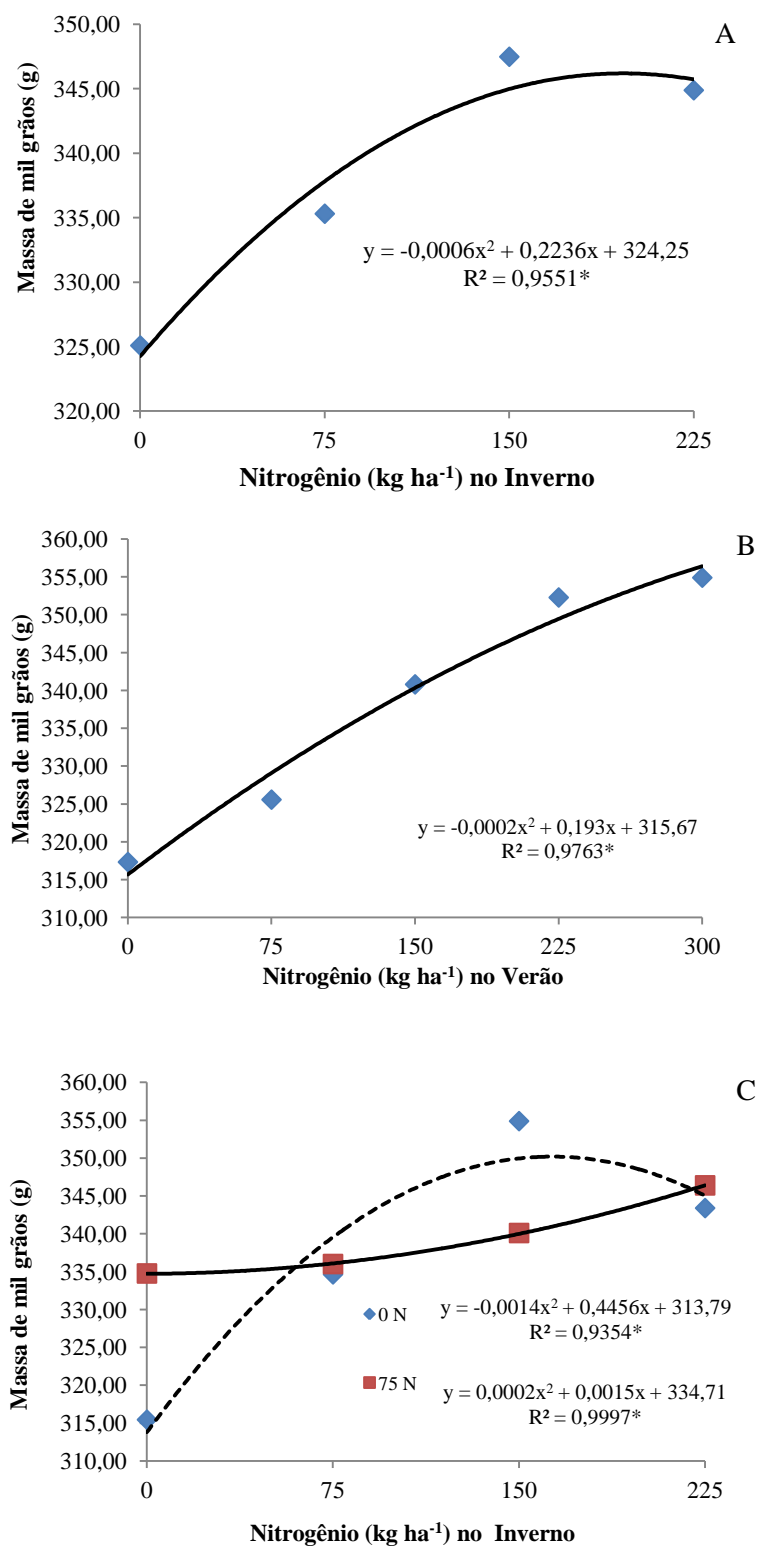


Figura 5. Massa de mil grãos de milho sob as doses de N aplicadas no Inverno (A), no Verão (B) e sob a interação das doses das de Pré-semeadura e Inverno (C). Guarapuava, PR, 2012.

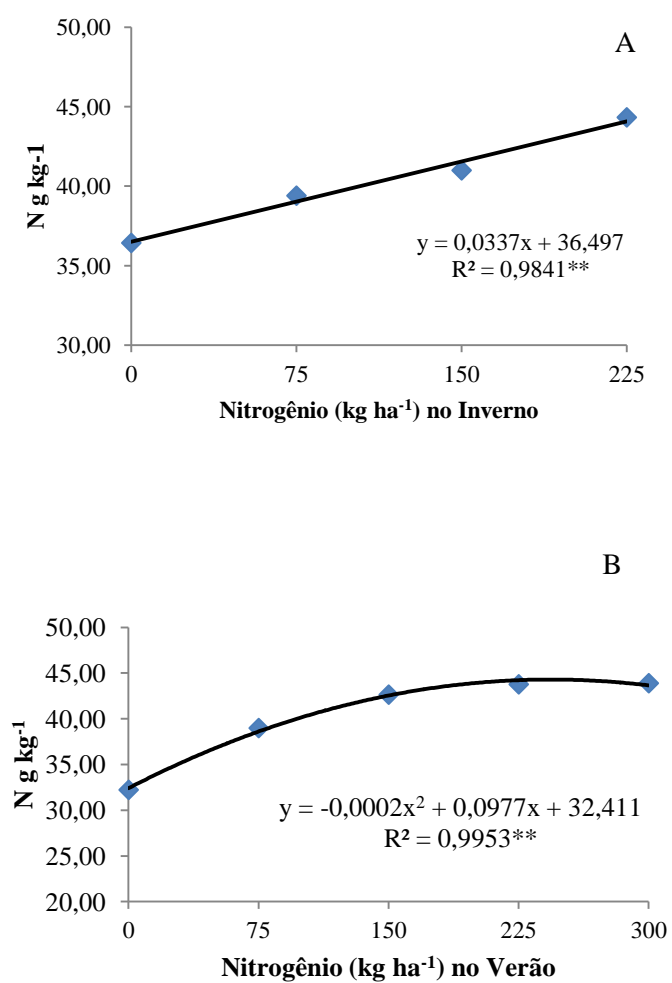


Figura 6. Teor de N foliar de milho sob as doses de N aplicadas no Inverno (A) e Verão (B). Guarapuava, PR, 2012.

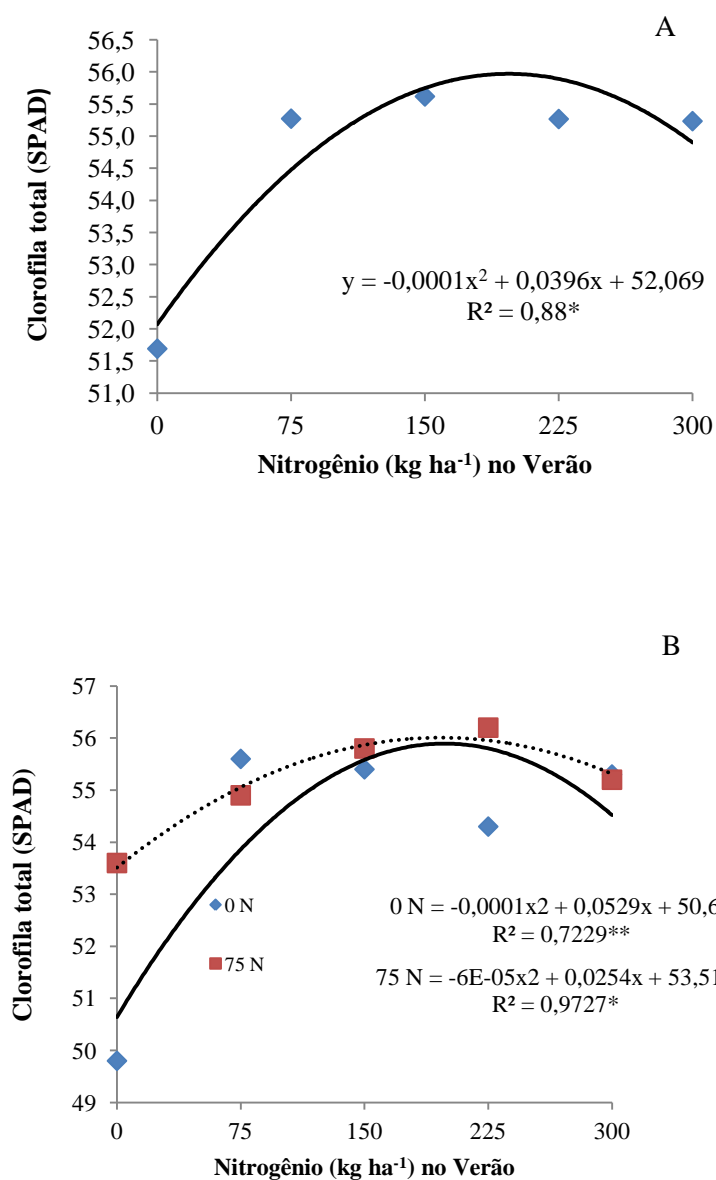


Figura 7. Teor relativo de clorofila total em folhas de milho sob as doses de N aplicadas no Verão (A) e sob a interação Pré-semeadura e Verão (B). Guarapuava, PR, 2012.

Tabela 1. Resumo da análise de variância indicando os fatores de variação, graus de liberdade (GL), quadrados médios e significância (F) para as variáveis avaliadas na cultura do milho. Guarapuava, PR, 2012.

FV	GL	QM						
		PG	FI	GF	GE	MMG	TN	TRC
Bloco	2	3571956 ^{ns}	0,07 ^{ns}	9,72 ^{ns}	157672 ^{ns}	632,08 ^{ns}	37,39 ^{ns}	20,70 ^{ns}
I	3	24235949*	0,35 ^{ns}	41,39*	115193 ^{ns}	2203,53*	330,38**	27,47 ^{ns}
Resíduo (a)	6	2553156	0,23	11,07	161586	602,62 ^{ns}	20,43	22,87
CV a (%)		4,49	0,91	3,38	22,59	2,30	3,54	2,76
Parcelas	11							
V	4	49819229**	0,25 ^{ns}	26,04*	11710 ^{ns}	6546,38**	602,54**	66,24**
V x I	12	14556700**	0,28 ^{ns}	11,16 ^{ns}	123102 ^{ns}	883,00 ^{ns}	25,34 ^{ns}	8,54 ^{ns}
Resíduo (b)	32	2632647	0,24	9,52	158539	772,32	24,41	6,34
CV b (%)		10,19	2,10	7,01	50,05	5,83	8,65	3,26
Subparcelas	59							
PS	1	12256250**	0,15 ^{ns}	5,56 ^{ns}	163540 ^{ns}	36,89 ^{ns}	82,28*	39,61*
PS x V	4	9299371**	0,37 ^{ns}	19,12 ^{ns}	210111 ^{ns}	999,77 ^{ns}	33,82 ^{ns}	18,85*
PS x I	3	7127574**	0,25 ^{ns}	35,26*	215303 ^{ns}	2922,79**	18,08 ^{ns}	3,10 ^{ns}
PS x V x I	12	6260789**	0,53 ^{ns}	10,73 ^{ns}	203787 ^{ns}	748,90 ^{ns}	21,08 ^{ns}	4,92 ^{ns}
Resíduo (c)	40	1288860	0,25	9,37	163188	581,57	18,50	5,69
CV c (%)		10,08	3,02	9,83	71,81	7,16	10,65	4,36
Total	119							
Média		11254	16,73	31,13	562,50	336,51	40,37	54,64

FV – Fontes de variação; CV - Coeficiente de variação; Inverno (I); Verão (V); Pré-semeadura (PS); Produtividade de grãos (PG) (kg ha⁻¹); Número de fileiras (FI); Número de grãos por fileira (GF); Número de grãos por espiga (GE); Massa de mil grãos (MMG) (g); Teor de N (TN) (g kg⁻¹); Teor relativo de clorofila total (TRC) (valor SPAD). ns – não significativo; * p<0.05; ** p<0.01 de probabilidade pelo Teste F.

4. CAPÍTULO 3 - The amounts and dynamics of nitrogen transfer to grasses differ in alfalfa and white clover-based grass-legume mixtures as a result of rooting strategies and rhizodeposit quality

The amounts and dynamics of nitrogen transfer to grasses differ in alfalfa and white clover-based grass-legume mixtures as a result of rooting strategies and rhizodeposit quality.

Gaëtan Louarn & Edina Pereira-Lopès & Joëlle Fustec & Bruno Mary & Anne-Sophie Voisin & Paulo Cesar de Faccio Carvalho & François Gastal

Received: 31 August 2014 / Accepted: 1 December 2014
Springer International Publishing Switzerland 2014

Abstract

Aims Differences in the ability to fix and transfer N have been shown between perennial legume species. However, the traits responsible for such variations are largely to be identified. This study aimed at comparing the dynamics of N transfer from alfalfa and white clover and test whether their differences resulted from difference in fixation, legume proportion, population dynamics or tissue composition.

Methods A three-year field experiment and a greenhouse experiment were carried out. Nitrogen fixation and transfer were assessed through ^{15}N dilution and difference methods.

Results Both experiments confirmed significant differences between legumes regarding N transfer capacity. Although alfalfa cumulated twice as much biomass and fixed nitrogen, it transferred

smaller amounts of N (59 versus 147 kg N.ha⁻¹ over three years in the field) under a delayed dynamic. The amounts of nitrogen transferred were related to recent decreases in legume population density. Moreover, root tissue composition differed; white clover had a higher proportion of fine roots with a lower C/N and lignin content. This resulted in more rapid N release from the severed roots of clover.

Conclusions The traits controlling plant persistency, root material turnover and residue quality may better explain N transfer dynamics than overall legume production and fixation.

Keywords Grass-legume mixture · Forage legumes · Nitrogen transfer · Nitrogen fixation · Residue quality · Population dynamics

Responsible Editor: Euan K. James.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11104-014-2354-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

G. Louarn (*) · E. Pereira-Lopès · F. Gastal
INRA, UR4 URP3F, BP6,
F86600 Lusignan, France
e-mail: gaetan.louarn@lusignan.inra.fr

E. Pereira-Lopès
Universidade Federal do Paraná,
Curitiba, PR, Brazil

J. Fustec
Groupe Ecole Supérieure d'Agriculture, UR LEVA,
F49007 Angers, France

B. Mary
INRA, UPR AgroImpact, Site de Laon, Pôle du Griffon,
F02000 Barenton-Bugny, France

A.-S. Voisin
INRA, UMR 1347 Agroécologie,
BP 86510, F21000 Dijon, France

P. C. de Faccio Carvalho
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil

Published online: 19 December 2014

 Springer

Introduction

The intensive use of artificial N fertilisers has greatly improved crop and forage production during the past century, but at the expense of considerable negative impacts resulting from greater losses of reactive nitrogen to the environment (Galloway et al. 2003; Jensen and Schjoerring 2011; Erisman et al. 2013). Crop and forage legumes fix up to 24–45 million tonnes (24–45 Tg) atmospheric nitrogen each year (Herridge et al. 2008), less than one third of annual N fertiliser inputs worldwide (Gruber and Galloway 2008). Increasing the contribution of biological nitrogen fixation by legumes to agricultural N inputs is currently central to different strategies to mitigate the environmental impacts of agriculture (Altieri 1999; Hopkins and Wilkins 2006; Lithourgidis et al. 2011; Gaba et al. 2015). A more widespread use of legume crops would indeed contribute to re-coupling the carbon and nitrogen cycles in agro-ecosystems and would enhance soil N pools, while increasing N use efficiency at the level of rotations (Drinkwater et al. 1998; Dabney et al. 2001; Peoples et al. 2009). However, the fate of legume N is still poorly characterised in many systems, including temporary grasslands. For instance, there is still a lack of quantitative benchmarks to make informed choices between different legume species, cultivars or management options (Snapp et al. 2005; Louarn et al. 2010; Ehrmann and Ritz 2014).

In production systems based on temporary grasslands, the inclusion of forage legumes in the rotation, or in a mixture with grasses, has long been recognized as a means of reducing the use of N fertilisers (Walker et al. 1954; Simpson 1965). Legumes contribute directly through their residues, and indirectly through the mineralization of soil N pools that have built up during the grassland phase, to the increase in N yield that is observed with subsequent crops in the rotation (Rasmussen et al. 2012). In addition, mixed legumes can lead to a more efficient use of soil N (Corre-Hellou et al. 2006; Bedoussac and Justes 2010a) and the significant release of fixed N during the grassland phase (Fustec et al. 2010), which also results in an improved N yield of the mixed grass and of the overall mixture (Nyfeler et al. 2011; Finn et al. 2013).

However, the net amounts of N transferred from field-grown legumes to associated grasses are highly variable. They can range from null or barely significant (mixtures of annuals; e.g. Walker et al. 1954) to the highest reported levels of 75–110 kg N·ha⁻¹·y⁻¹ (e.g. Elgersma and

Hassink 1997; Høgh-Jensen and Schjoerring 2000). The first reason for variations in N transfer has generally been attributed to the considerable variability in atmospheric N inputs into these systems. Since most of the legume N in mixtures is derived from atmospheric fixation (Ledgard and Steele 1992; Carlsson and Huss-Danell 2003; Høgh-Jensen et al. 2004), the biomass of mixed legumes and the proportion grass and legume have mainly been proposed to explain differences between sites, species or cultivars (Ta and Faris 1987a; Heichel and Henjum 1991; Schipanski and Drinkwater 2012). An age effect has also been identified consistently in several studies, with N transfer generally increasing in older stands (Burity et al. 1989; Mallarino et al. 1990).

Apart from this direct quantitative effect of fixed N, few insights have been gained from these numerous experiments regarding the reasons for specific and genotypic differences in N transfer capacity in the field, and the plant traits that might affect it. Yet significant differences between species have been established among clovers regarding the relationship between legume biomass and nitrogen transfer to companion grasses, suggesting a more efficient N transfer in white clover-based mixtures (Mallarino et al. 1990). Differences in N transfer pathways have also been hypothesized. However, although the exudation of ammonium and soluble compounds from the roots (Ta et al. 1986; Brophy and Heichel 1989; Paynel and Cliquet 2003; Lesuffleur et al. 2013) or N transfer through a mycorrhizal mycelium (Bethlenfalvay et al. 1991) may occur, their significance under field conditions still needs to be confirmed. More commonly, the senescence of roots and nodules has been reported as the principal N transfer pathway in the absence of grazing animals (Marriot and Haystead 1993; Dubach and Russelle 1994; Fustec et al. 2010). Unfortunately, reports on N allocation to roots and species variations in root traits and composition are scarce in forage legumes (Fort 2013), particularly in the context of long-term field experiments.

Recent papers focused on the fate of root residues have demonstrated that root chemical composition, rather than root morphological characteristics, drive their decomposition rate and potential N release (Aulen et al. 2012; Birouste et al. 2012). In legumes, specific differences in N release from dead nodules have been shown to be influenced by the forms of N present in these nodules (Wardle and Greenfield 1991). By comparing the residual N effect of contrasting grass-legume mixtures at the rotation level, Rasmussen et al. (2012)

showed that N yield and root biomass accumulation in the temporary grassland phase did not necessarily lead to a stronger residual N effect on the subsequent cereal. The choice of legume species markedly affected both the N input in the production system and the dynamics of fixed N release. As a consequence, although a white clover-based mixture yielded less than half the N fixed by alfalfa-based mixtures, it had similar impacts on barley N nutrition the next spring. The form or quality of residues could be as important as fixed N amounts in benefiting subsequent or associated crops.

In the present study, we used the results of a long-term field experiment and a greenhouse experiment to compare the amounts of fixed N and the dynamics of its transfer to companion grasses in alfalfa and white clover-based mixtures, two forage legumes contrasting in their growth potential and root morphogenesis (tap-root versus fasciculated nodal roots, Forde et al. 1989). The objectives were to assess the differential effects of the two species i) on grass growth and nitrogen status, and ii) on the dynamics and efficiency of legume N transfer. Dry matter yield, nitrogen fixation and accumulation, plant population dynamics, root traits and root composition were characterised in order to test whether the overall fixation or quantitative/qualitative aspects of legume residues better explained the N-transfer patterns observed in mixed grasses in the field.

Materials and methods

Plant materials

Two experiments were carried out at the INRA Lusignan research station, France (46.26 N, 0.11E), to assess the impacts of contrasting forage legumes on the growth and N acquisition of grasses in grass-legume mixtures. Both experiments used the same species and cultivars, namely alfalfa (*Medicago sativa* L.) cv. "Orca", white clover (*Trifolium repens* L.) cv. "Huia", perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cv. "Milca" and tall fescue (*Festuca arundinacea* Shreb.) cv. "Noria".

Experiment 1

Growing conditions

The first experiment was performed in the field from April 2011 to November 2013. The soil at the Lusignan

site is a Dystric Cambisol (IUSS Working Group WRB 2006) with silty-loamy texture in the surface and clay in the subsoil horizons (Chabbi et al. 2009). It is composed of four soil horizons: a plough layer, overlaying two red-brown upper horizons characterised by a loamy texture, and a lower clayey rubefied C horizon, which can be considered as paleosol horizon. The silt content increases from 23 % at the top to 47 % at the bottom of the root profile, with an homogeneous sand content of 20 %. The organic matter content in the top 30 cm layer is 18 g.kg⁻¹. The residual mineral N levels at sowing in the spring of 2011 were 15, 13 and 9 kg N.kg⁻¹ in the 0-30, 30-60 and 60-90 cm layers, respectively.

The experimental design consisted in a split-plot design with four blocks and randomized treatments (species and mixtures) within the sub-blocks. The controlled factor within blocks was for ¹⁵N soil labelling, separating a labelled from a natural abundance experimental unit. Five treatments were compared: pure tall fescue (FE), pure ryegrass (RG), an alfalfa-fescue mixture (A-FE), a white clover-ryegrass mixture (WC-RG) and a white clover-fescue mixture (WC-FE). All treatments were replicated in the two sub-blocks, except for the WC-FE treatment which was grown in the natural abundance sub-block only. Each plot was 1.25 m×3 m, sown in 15 cm spaced rows. The seeding rates were 30, 30, 25 and 6 kg.ha⁻¹ for fescue, ryegrass, alfalfa and white clover, respectively. Half rates were used in the mixtures, with grass and legume species being planted in alternate rows.

In the labelled experimental unit, ¹⁵N fertilizers (K¹⁵NO₃ solution, 1 atom % excess) were applied at a rate of 5 kg N.ha⁻¹ just after emergence, and shortly after each harvest, on 1 m² delineated zones in the centre of each plot. The solution was distributed uniformly on the soil in the inter-rows, carefully avoiding above-ground plant parts. In the absence of any rainfall immediately after the K¹⁵NO₃ application, 20-30 mm irrigation was applied to the entire experiment in order to facilitate the infiltration of labelled nitrate (this occurred three times in 2011 and twice in 2012).

The plants were cut (at 5 cm above soil level) three times in 2011 (harvests numbered 1, 2, 3) and four times in 2012 (harvests 4-7) and 2013 (harvests 8-11). Cutting was performed when alfalfa had reached a full bloom stage (every four to five weeks in summer), so that the persistence of alfalfa was not affected by the cutting regime.

During the initial growth period, weeds were removed manually from all plots to facilitate stand

establishment. Further weed control was ensured in pure grass stands throughout the experimental period to prevent any establishment of weed legumes. PK fertilizers were applied annually in March at rates of 80 kg P.ha⁻¹ and 40 kg K.ha⁻¹.

Plant measurements

At each harvest, 50 cm of the two central rows were collected manually from each plot. In the labelled sub-blocks, this corresponded to the centre of the labelled zones. The grass and legume species were then separated. The number of shoots (alfalfa) and leaves (white clover) were counted for the legumes. Root samples were also collected at each harvest on a one-meter row per plot to evaluate the number of taproots and to monitor plant density in the alfalfa stands. The samples were then dried in an oven at 60 °C for 48 h, and weighed to evaluate dry matter production.

Furthermore, in the course of each regrowth cycle, the nitrogen status of mixed and pure grass plants was measured approximately two weeks after cutting to assess the degree of growth limitation due to N availability. The nitrogen content of upper leaves (top 5 cm of sun-exposed leaves of 5 to 8 tillers) was used as a proxy for the Nitrogen Nutrition Index (NNI). A linear relationship established previously on various forage grasses (including rye-grass and tall fescue; Gastal et al. 2014) was then used to convert the leaf N concentration (NI) into the NNI:

$$\text{NNI} = \frac{1}{4} (0.242 \cdot \text{NI} - 0.041) \quad \delta\text{P}$$

The leaf samples were dried at 60 °C, finely ground with a vibrating ball mill (Retsch MM200, Germany) and analysed for their nitrogen concentration.

After the last cut in 2013, root samples were collected from the 0–20 cm horizon along several metres of the rows in order to obtain samples large enough for a fibre content analysis of the different root fractions. Taproots were separated from fine roots and nodules. The levels of water soluble compounds, cellulose, hemicelluloses and lignin were determined in each fraction according to the Van Soest method (Van Soest 1963), using a Fibersac 24 fibre analyser (Ankon, Macedon, NJ, USA). Additionally, fine root morphological traits were determined for each legume species. Fresh roots were spread out on a transparent sheet and scanned at a resolution of 400 dpi. A digital image analysis system

(Winrhizo, version 2003b, Regent Instrument, Québec, Canada) was used to determine root length. Specific root length (SRL, m.g⁻¹) was calculated as the ratio between total fine root length and fine root dry mass (oven-dried for 48 h at 60 °C).

Experiment 2

Growing conditions

A second experiment was carried out in a greenhouse between May and November 2013. All plants were grown in 2.5 L pots (12×12×19 cm) filled with an N-free substrate (fine quartz sand, 0.8–1.4 mm mesh). The pots were organised in rows with a 15 cm inter-row. They were automatically ferti-irrigated every two hours with a complete nutrient solution devoid of mineral nitrogen (0 mMol N). The nutrient solution was prepared using demineralised water and sampled weekly to assess the absence of NO₃⁻ and NH₄⁺. All seeds were pre-germinated in the dark at 25 °C for 72 h. A single plant of each species was transplanted into each pot, according to the treatments described below. The experimental design was a split-plot with four replicated blocks and eight pots per treatment (four per grass species), randomly distributed in each sub-block. The controlled factor within blocks was separating treatments with legumes (mixtures/dead legumes) from treatments without legumes (pure grasses).

The treatments consisted in comparing alfalfa-fescue (A-FE) and white clover-ryegrass mixtures (WC-RG) with pure grass controls of each grass species grown either on a N-free medium (FE and RG) or on the same medium supplemented with the fresh root mass of legumes recently severed below the taproot collar (FE-dead A, RG-dead WC). For these two latter treatments, one alfalfa or clover plant in each pot was preliminarily grown under the same conditions for three months before being killed, and the grass plants being immediately transplanted. Two periods were distinguished for the management of grass-legume mixtures (A-FE, WC-RG): i) plants remained uncut during the establishment period (first three months) and ii) the frequent and severe defoliation of legume plants was then applied for two months (all legume shoots cut to 1 cm every week).

The legume seedlings were inoculated with rhizobia 4 days after being transplanted. Natural populations found in the field used for Exp. 1 were employed. The

inocula were prepared by dissolving a mixture of several soil samples collected next to white clover and of alfalfa root systems within the 0–20 cm horizon. Ten g of soil were mixed in 1 L deionized water. A volume of 10 mL of this suspension was then added to each pot. The same solution was also used regularly to provide inocula of bacteria ensuring ammonification and nitrification in order to facilitate residue mineralization in the sand. To achieve this, 5 ml were added to each pot on a weekly basis. We determined that the amounts of nitrogen were negligible in the inocula (i.e. NO_3^- and NH_4^+ concentrations at 0.9 and 0.09 mg.L^{-1} , respectively).

Plant measurements

The dry mass of grass plants was monitored regularly under each treatment. Four harvests were carried out at different dates, according to grass plant development. At each harvest, one plant of each grass/legume mixture and its corresponding pure grass control was sampled in each block. The shoots and roots were separated.

In the dead legume treatments (FE-dead A, RG-dead WC), the initial dry mass and elemental composition of legume roots present in the pots were characterised. The taproot, fine roots and nodules were separated. The samples were dried at 60 °C for 2 days, weighed to determine the dry mass and then ground in a vibrating ball mill (MM400, Retsch Corporation, Reineische, Germany).

Elemental and isotopic analyses

Plant samples from Exp. 1 and Exp. 2 were all analysed in terms of their ‘bulk’ elemental (C and N concentrations) and isotopic (^{15}N) compositions using an Elemental Analyser coupled with an Isotopic Ratio Mass-Spectrometer (EA-IRMS, Flash EA and Delta V Advantage systems, Thermo Electron Corporation, Bremen, Germany). The ^{15}N abundance of plant samples was expressed in absolute unit of Atom %.

Calculations of N fixation and transfer

^{15}N isotope dilution

The fraction of N derived from the atmosphere in legume harvested biomass (%Nd_{fa}) was calculated from

^{15}N -labelled samples using the isotope dilution method (Unkovitch et al. 2008):

$$\% \text{Nd}_{fa} = \frac{\text{Atom\%}_{\text{puregrass}} - \text{Atom\%}_{\text{mixedlegume}}}{\text{Atom\%}_{\text{puregrass}}} * 100 \quad (2)$$

Similarly, for the isotopic composition of grass harvested biomass at each cut, the isotope dilution method was used to calculate the fraction of legume-derived N (including atmospheric-derived and soil-derived N) transferred from legume to grass (%Nd_{fl}) as (Ta and Faris 1987b):

$$\% \text{Nd}_{fl} = \frac{\text{Atom\%}_{\text{puregrass}} - \text{Atom\%}_{\text{mixedgrass}}}{\text{Atom\%}_{\text{puregrass}} - \text{Atom\%}_{\text{mixedlegume}}} * 100 \quad (3)$$

N transfer estimates

Two calculation methods were used to determine the amount of N transferred from legumes to grass (kg N.ha^{-1}). The first approach, hereinafter referred to as the isotopic method, was based on the %Nd_{fl} and N yield of mixed grass (Ta and Faris 1987b):

$$\text{NT}_{\text{isotopic}} = \frac{\% \text{Nd}_{fl}}{100} * \text{N Yield}_{\text{mixedgrass}} \quad (4)$$

The second, hereinafter referred to as the difference method, simply subtracted the N yields of mixed grass from its corresponding pure grass treatment over the same period:

$$\text{NT}_{\text{difference}} = \text{N Yield}_{\text{mixed grass}} - \text{N Yield}_{\text{pure grass}} \quad (5)$$

This latter method does not normally presume that supplemental N originates exclusively from legume (apparent N transfer). In Exp. 1, it was used to help to quantify the overall N provision by mixed legumes per unit of land area (Simpson 1976). Under the particular growing conditions of Exp. 2, however (grass-legume mixture grown in an N-free medium - atmospheric fixation as the only N source for the two mixed species), it represented the net N transfer from legume to grass.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R software (<http://www.r-project.org/>). Student tests and analyses

of variance (ANOVA, aov procedure) were used to test for significant differences between means.

Results

Total yields and species proportions in the field

The annual dry matter production and species proportions in the different treatments studied in Exp. 1 are presented in Fig. 1. The total yields of mixtures significantly exceeded those of pure grasses, irrespective of the year and grass-legume combination. White clover-based mixtures achieved similar yields with the two grass species (9 and 13 t.ha⁻¹.y⁻¹ in the second and third years, respectively), but were significantly less productive than the alfalfa mixture (A-FE, 14 and

20 t.ha⁻¹.y⁻¹). Despite a half-sowing density, the yield of grasses in mixture always equalled (two out of nine annual yields), or even exceeded (seven out of nine) those of the corresponding grass in the pure stand. After the first year, the relative yield of grasses was significantly higher in mixtures with white clover (ranging from 2.6 to 8) than with alfalfa (ranging from 1 to 2.1).

The dry matter yield of legumes, and their proportion in the mixture, differed between grass-legume mixtures. The annual yield of legumes increased throughout the experiment with the A-FE and WC-RG mixtures (reaching up to 13 t.ha⁻¹.y⁻¹ in the most productive A-FE), but not in the WC-FE mixture, where it remained limited until the third year (<2.5 t.ha⁻¹.y⁻¹). The same ranking for the proportion of legume was consistently observed between treatments over time: A-FE>WC-RG>WC-FE.

Population dynamics, nitrogen yield of legumes and amount of fixed nitrogen

The population dynamics of legumes differed markedly between alfalfa and white clover-based mixtures (Fig. S1). Plant density decreased regularly in A-FE, from 352 plant.m⁻² in the first harvest to 90 plant m⁻² in the last. But during this period, alfalfa plasticity resulted in increasingly larger plants, and overall shoot density which was not significantly affected (within the range of 320-440 shoots.m⁻² for all cuts, P>0.36). By contrast, major variations in shoot and phytomer numbers were observed for white clover throughout the experiment. On two occasions, during the summers of the first and second years, clover markedly receded and came close to extinction. These periods were followed by bursts of growth in the following spring, alternating clover-rich and clover-poor periods. As expected from the yield results, clover development was more limited in WC-FE.

The nitrogen accumulated in legumes (or N yield) also differed between grass legume combinations (Fig. 2a). Overall, the differences in N yields mirrored the differences reported relative to dry matter production: A-FE>WC-RG>WC-FE. Nitrogen yield was similar with the three combinations in the first year for the different mixtures studied, but proved different afterward. The differences between treatments peaked in the third year, during which legume-N yields reached 320, 190 and 70 kg N.ha⁻¹.y⁻¹ in A-FE, WC-RG and WC-FE, respectively. Calculation of the Ndfa based on

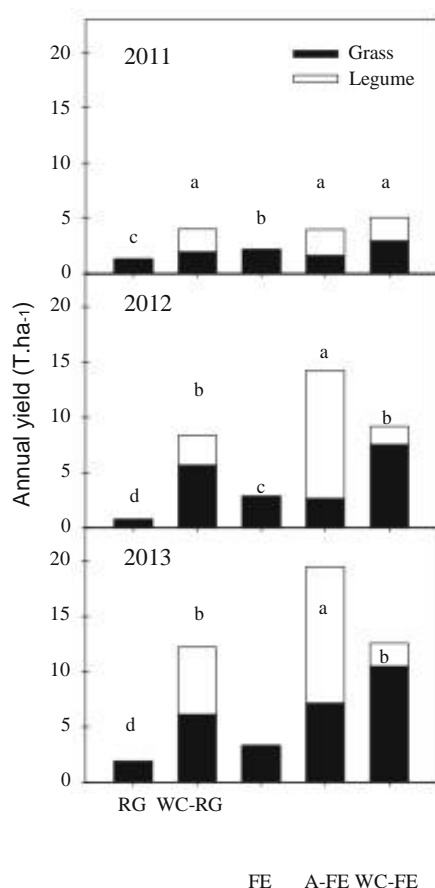
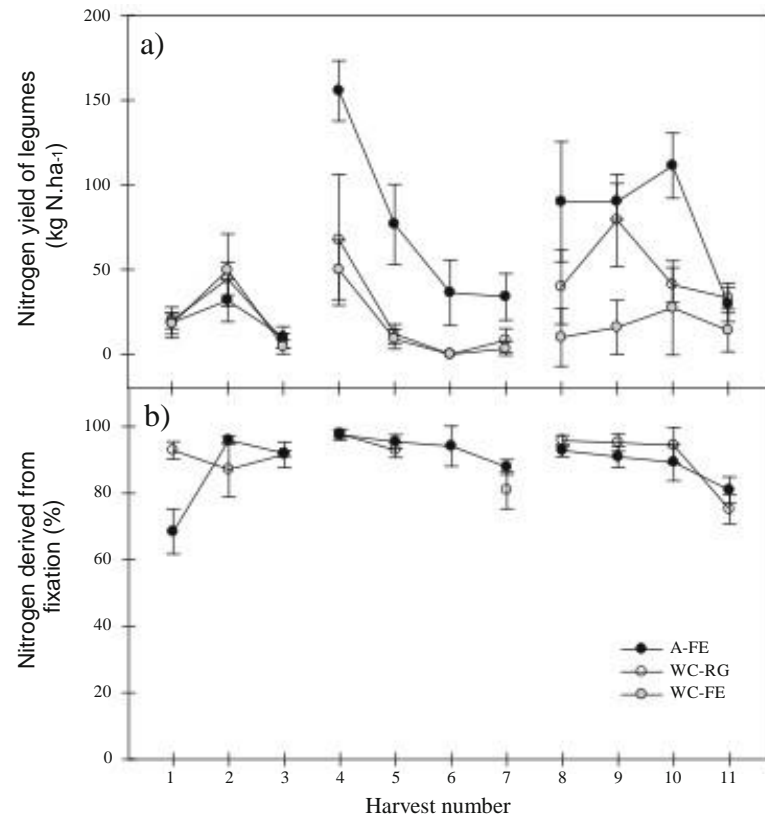


Fig. 1 Annual yields and grass-legume yield distribution in the different treatments in Exp. 1 for the three years after sowing. The five treatments were pure tall fescue (FE), pure ryegrass (RG), alfalfa-fescue mixture (A-FE), white clover-ryegrass mixture (WC-RG) and white clover-fescue mixture (WC-FE). Letters indicate homogeneous groups displaying significant differences in total annual yield ($P<0.05$)

Fig. 2 Amounts of nitrogen exported in the harvested biomass of mixed legumes (a) and the proportion of this nitrogen derived from symbiotic fixation (b) for all cuts, three years after Exp. 1 sowing. The three treatments with legumes were alfalfa-fescue mixture (A-FE), white clover-ryegrass mixture (WC-RG) and white clover-fescue mixture (WC-FE). Vertical bars indicate standard deviations (N=4)



¹⁵N labelling of the soil showed that the nitrogen in mixed legumes was almost entirely derived from the fixation of atmospheric N by nodules (Fig. 2b). In all but two harvests, the Ndfa exceeded 90 % and in all but one (first alfalfa cut) it exceeded 80 %. Except for the initial growth period (first cut), the proportion of nitrogen derived from fixation did not differ between alfalfa and white clover ($P>0.4$). Therefore, the amount of nitrogen fixed, and the N input in the studied treatments, were both directly related to the growth and N yield of mixed legumes.

Allocation to roots and composition of legume roots

The root mass and root composition measured on alfalfa and white clover at the end of Exp. 1 and 2 are presented in Table 1. As reported for aboveground dry matter, the allocation of biomass to roots was higher in alfalfa than in white clover. This difference in root dry matter between species was significant during early developmental stages (a three-fold difference), and was emphasised in three year old stands. The composition of root systems also differed markedly between the two species,

and these differences remained consistent irrespective of stage and experiment. Within the root system, alfalfa allocated a larger share of its biomass to perennial taproots, whereas white clover invested relatively more in the development of fine roots. Overall, despite a very different total root mass, the fine root mass in the top-20-cm of soil was within the same range for the two species at the end of Exp. 1 (0.05 ± 0.02 to 0.10 ± 0.05 t.ha⁻¹).

Different root parts displayed contrasted chemical compositions. In the two species, taproots presented higher C/N ratios (about 25) and lower fibre (i.e. a higher mass proportion in the cytoplasm) and lignin concentrations than fine roots. Alfalfa roots had a lower fibre content and significantly higher C/N ratios than white clover, regarding both taproots and fine roots. The C/N ratios measured in seedlings and three year old plants were identical, except for alfalfa fine roots that exhibited a significant increase in older plants (C/N ratio reaching values close to 20). The fine roots of alfalfa also had the highest lignin content and the lowest SRL.

Table 1 Total root mass and root composition measured on alfalfa and white clover plants during the early developmental stage (first full bloom stage, Exp. 2) and in three-year-old stands (Exp. 1).

Standard deviations are indicated in brackets. Letters indicate homogeneous groups displaying significant differences ($P < 0.05$)

		Total root mass	Root system proportion (%)	C/N	Soluble (%)	Total fibre (%)	Lignin (%)	SRL (m.g ⁻¹)
First year plants*	Alfalfa Fine roots+ nodules	2.34 (0.74) ^a	21.9 (4.8) ^d	15.5 (2.1) ^b	-	-	-	78 (8) ^b
	Alfalfa Taproot		78.1 (4.8) ^a	27.0 (4.3) ^a	-	-	-	-
	Clover Fine roots+ nodules	0.67 (0.24) ^b	59.8 (8.4) ^b	13.9 (1.9) ^b	-	-	-	127 (31) ^a
	Clover Taproot		40.2 (8.4) ^c	25.4 (6.6) ^a	-	-	-	-
Third year plants**	Alfalfa Fine roots+ nodules	2.96 (1.42) ^a	3.7 (0.4) ^d	19.3 (0.7) ^b	54.7 (1.5) ^b	45.3 (1.5) ^c	9.4 (0.2) ^a	16 (1) ^b
	Alfalfa Taproot		96.3 (0.4) ^a	26.6 (7.1) ^a	61.7 (1.1) ^a	38.3 (1.1) ^d	4.4 (0.2) ^d	-
	Clover Fine roots+ nodules	0.13 (0.04) ^b	41.1 (1.4) ^c	13.9 (0.6) ^c	49.4 (1.1) ^d	50.6 (1.1) ^b	8.3 (0.4) ^b	67 (12) ^a
	Clover Taproot		58.9 (1.4) ^b	24.0 (2.3) ^a	47.9 (1.4) ^c	52.1 (1.4) ^a	7.5 (0.4) ^c	-

* Exp. 2 - Root mass at first full bloom stage of alfalfa (g.plant⁻¹)

** Exp. 1 - Root mass in the 0-20 cm horizon in the 11th harvest (t.ha⁻¹)

Impact of legume species on the nitrogen nutrition of mixed grasses

The nitrogen nutrition index of pure and mixed grasses was assessed regularly during Exp. 1. The resulting dynamics are presented in Fig. 3. Throughout the experiment, the NNI of grasses remained below 1 (even below 0.8 in all but one cut), indicating significant N stress in all pure and mixed stands for the two grass species studied. Thus neither the natural provision of N by the soil, nor the additional N potentially provided by mixing legumes, allowed to achieve maximum growth for FE or RG.

However, the presence of legumes in mixtures significantly improved the nitrogen nutrition of grasses when compared to the corresponding pure grass. Grass NNI values were all low and identical shortly after emergence (about 0.4-0.5 at harvest 0), and increased significantly in all mixtures by the end of the first growth period (harvest 1). Further NNI increases were then recorded during the first two years in all mixtures (up to 0.8), whereas pure grass values remained lower and steady (0.4 to 0.6). In the third year, the NNI decreased but remained higher in mixtures (except for WC-FE in harvests 8 and 9). Grass NNI patterns differed between mixtures. The NNI increased more slowly in the A-FE combination than in white clover-based mixtures during the first year. Conversely, A-FE achieved the highest NNI in the third year, within the

same range as WC-RG but significantly higher than WC-FE.

Nitrogen yield and origin of nitrogen in mixed grasses

The amount of nitrogen exported in the harvested parts of pure and mixed grasses is presented in Fig. 4 for the different cuts performed during Exp.

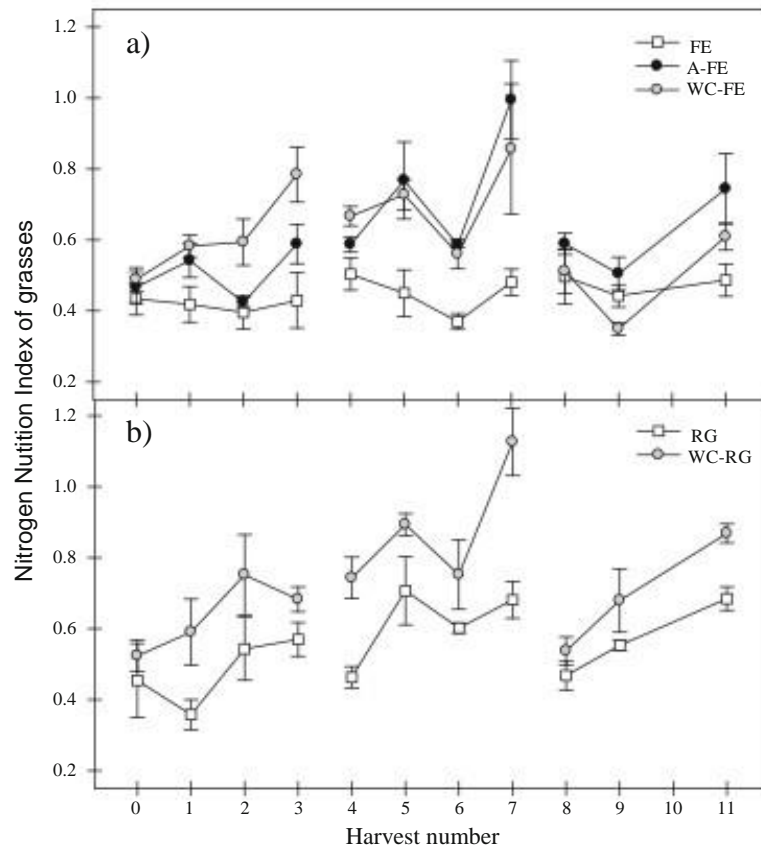
1. Despite a half sowing density, the N yield of mixed grasses was always equal or superior to that of the corresponding pure grass, irrespective of the cut and treatment (Fig. 4a and b for FE and RG, respectively). For instance, the maximum annual yield in year 3 was 95-140 kg N.ha⁻¹ in mixed grass versus 30-36 kg N.ha⁻¹ in pure grass. The N yield patterns of the two grass species associated

with white clover proved to be very similar: from the start of the first year onwards (cut 2), significant supplementary exports were recorded compared to pure grasses, and these were amplified during the

second and third years. No significant effect of the grass species occurred, except during the third year when FE yielded more N in spring and summer

(cuts 8 and 10) than RG. By contrast, very different N yield patterns were seen when comparing the same grass (FE) associated with different legumes. Under the A-FE combination, mixed grass exported strictly the same amounts of N as pure grass during the first year, but significant supplementary export of

Fig. 3 Nitrogen nutrition index of pure and mixed tall fescue (a) and rye-grass (b) for all cuts, three years after Exp. 1 sowing. Harvest number zero refers to a sampling date shortly after emergence, during the initial growth period. The five treatments were referred as pure tall fescue (FE), pure rye-grass (RG), alfalfa-fescue mixture (A-FE), white clover-ryegrass mixture (WC-RG) and white clover-fescue mixture (WC-FE). Vertical bars indicate standard deviations (N=4)



N was observed in the course of the second year. This increased progressively to even that of clover mixtures during the third year.

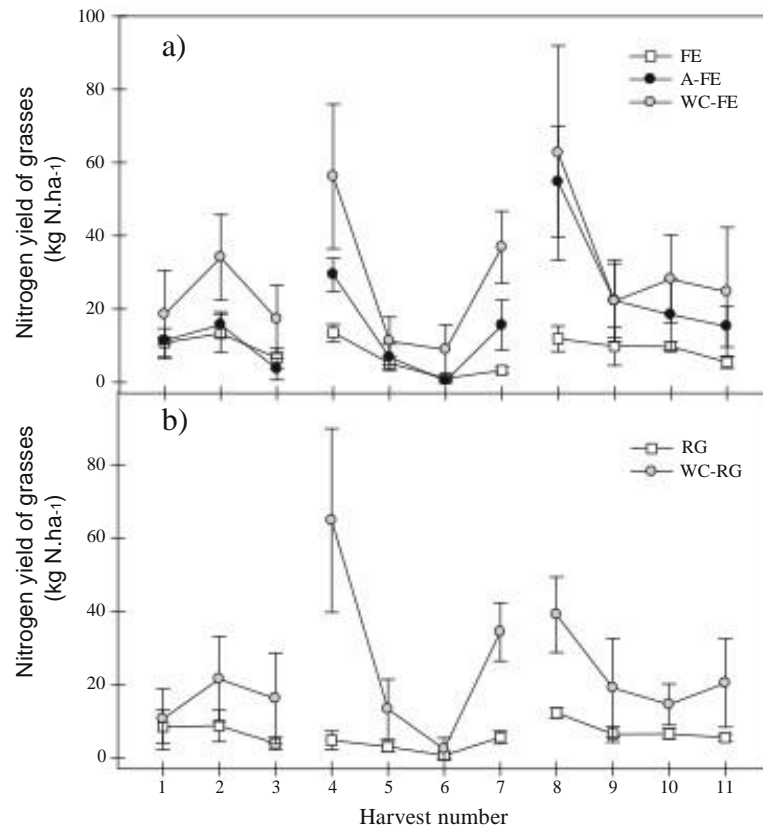
The ^{15}N compositions of pure and mixed plants for A-FE and WC-RG are compared in Fig. 5 in order to assess the origin of harvested N in the different species covered by these treatments. Interestingly, grass mixed with alfalfa and clover displayed very different patterns when compared to the corresponding pure grass. In WC-RG, mixed grasses (relying on soil and legume N) were significantly devoid of ^{15}N when compared to pure RG (relying on soil N only) at all harvests, indicating a significant and systematic contribution of legume N to grass nutrition. By contrast, in A-FE, no difference was observed between pure and mixed FE during the first year. A significant difference developed during the second and third years, but not at all harvests, and with ^{15}N enrichments reduced to a lesser extent than in a white clover-based mixture. Fig. S2 illustrates the proportion of N derived from

the legume in each of the two mixtures. Significant differences in the Ndfl confirmed that the dynamic of legume N availability differed markedly between the clover and alfalfa mixtures (e.g. no N transfer with alfalfa during the establishment year), and that the proportion of Ndfl was lower with alfalfa than with clover over a three-year span (e.g. 30–40 % versus 60–70 % in years two and three).

Net nitrogen transfer in the field

The net values of N transfer to mixed grasses estimated using the difference (Eq. 5) and the isotopic (Eq. 4) methods are presented for the A-FE and WC-RG mixtures in Fig. 6. The two methods showed similar N transfer patterns, but they differed markedly in terms of amounts and dynamics between the A-FE and WC-RG mixtures. N transfer to a companion grass occurred more rapidly and was quantitatively more important during the first two years with white clover ($P < 0.01$). Alfalfa mixtures

Fig. 4 Amounts of nitrogen exported in the harvested shoots of pure and mixed tall fescue (a) and pure and mixed rye-grass (b) for all cuts, three years after Exp. 1 sowing. The five treatments were referred as pure tall fescue (FE), pure ryegrass (RG), alfalfa-fescue mixture (A-FE), white clover-ryegrass mixture (WC-RG) and white clover-fescue mixture (WC-FE). Vertical bars indicate standard deviations (N=4)



reached levels similar to white clover mixtures only at a later stage, during the third year ($P>0.4$). However, significant differences in the absolute estimates were found by the two methods. The N difference method produced systematically higher values than the isotopic method, both at the level of different cuts (WC-RG: $N_{\text{diff}}=0.68.N_{\text{isotopic}}+0.21$, $r^2=0.96$, $N=11$; A:FE: $N_{\text{diff}}=0.55.N_{\text{isotopic}}+0.0.8$, $r^2=0.97$, $N=11$) and cumulated over a year (Fig. 6). These differences accounted for 15-30 and 8-30 kg N.ha⁻¹ in years two and three, respectively.

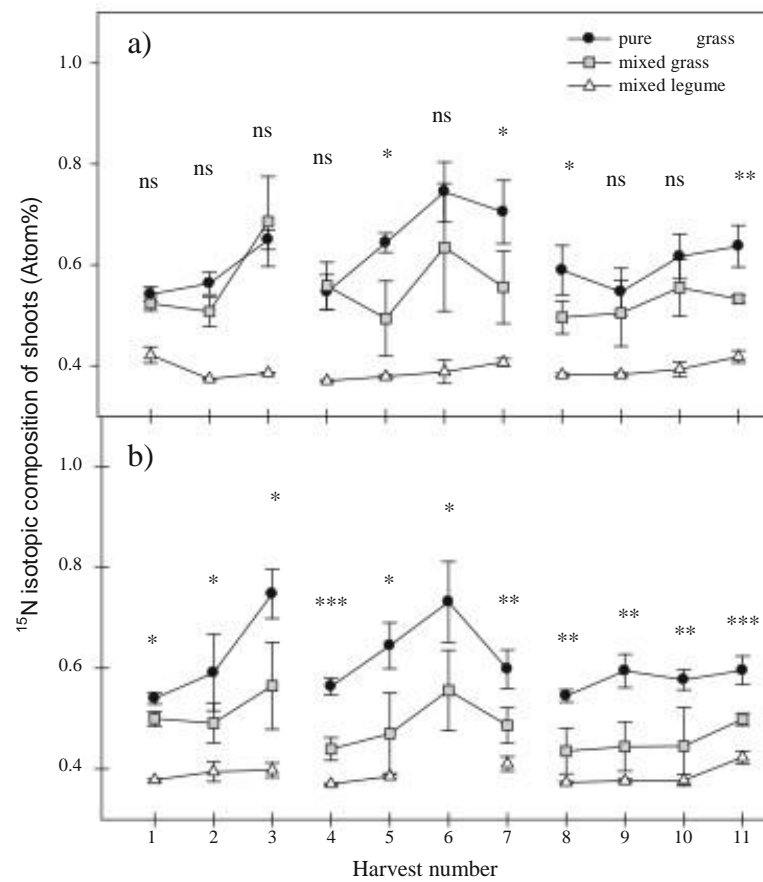
The amounts of nitrogen transferred to grasses proved to be negatively related to recent changes in legume population dynamics in both white clover and alfalfa-based mixtures (Fig. 7). Reductions in phytomer density (WC-RG, WC-FE) or plant density (A-FE) gave rise to increased N transfer. The relationship established in the short term with variations during the previous cut appeared to be closer for white clover ($r^2=0.61$) than for alfalfa-based ($r^2=0.33$) mixtures. Extending to several

cuts the time frame to integrate changes in density improved the relationship for alfalfa (r^2 values rising to 0.55 and 0.39 when integrating the two and three previous cuts, respectively), but not for white clover.

Net nitrogen transfer under controlled conditions in an N-free medium

The differences between alfalfa and white clover-based mixtures in terms of N transfer dynamics were further assessed under artificial conditions that restricted all N sources to the grass except for the N fixed by its companion legume (Fig. 8). The amounts of N transferred from uncut seedling plants of alfalfa and clover were not significant for the two species until the full bloom stage under these conditions. However, A-FE and WC-RG differed in their response to the frequent defoliation of the legume plants afterwards. A significant amount of N was captured by the companion grass

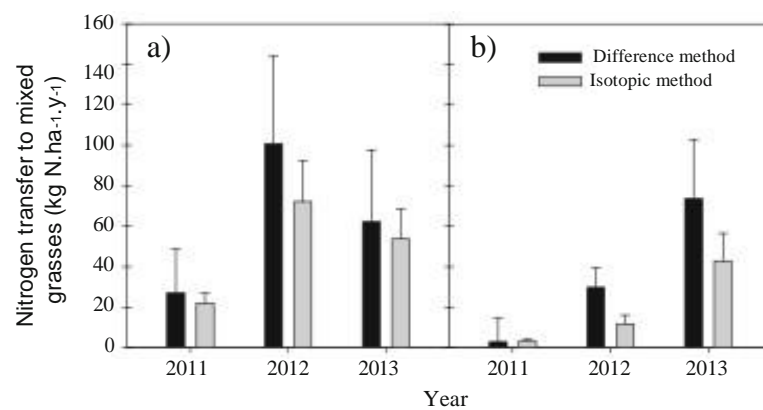
Fig. 5 Isotopic composition (Atom%) of harvested shoots in pure tall fescue and the alfalfa-fescue mixture (a) and pure ryegrass and white clover mixed ryegrass (b) for all cuts, three years after Exp. 1 sowing. Stars indicate the level of significance of the mean difference between pure and mixed grasses (student test; ns: non significant, * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001)



from frequently cut clover, but not from cut alfalfa (Fig. 7a). A more drastic cut, causing the death of the legume, resulted in significant transfers under both systems, but with different net transfer dynamics (Fig. 7b).

Despite a three-fold smaller mass of dead root legume material (Table. 1), the transfer of N to grass from clover residues occurred more rapidly and at a higher rate than from alfalfa residues.

Fig. 6 Net nitrogen transferred to companion grass in a white clover-rye-grass mixture (a) and alfalfa-fescue mixture (b) as calculated using the difference method and isotopic methods for the three years of Exp. 1. Vertical bars indicate standard deviations (N=4)



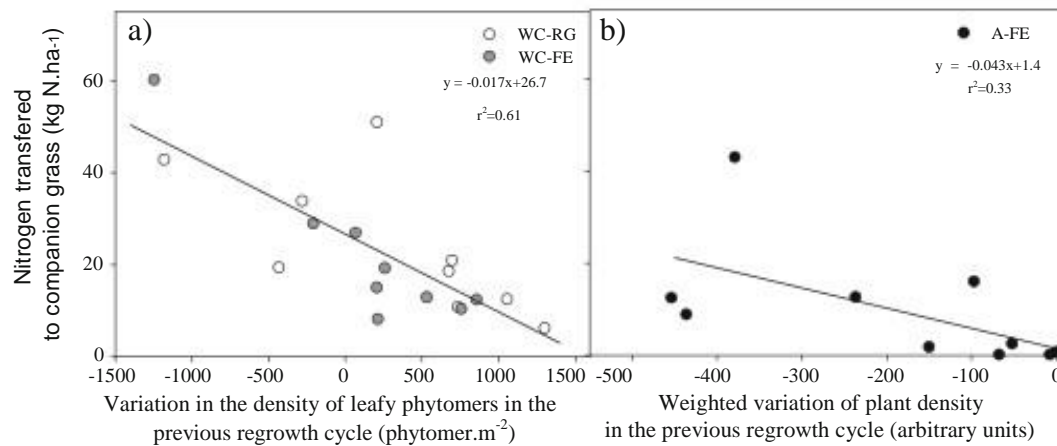


Fig. 7 Net nitrogen transferred to companion grass in white clover- (a) and alfalfa-based mixtures as explained by changes in legume population dynamics during the previous growing cycle. The three mixed treatments were referred as alfalfa-fescue mixture (A-FE), white clover-ryegrass mixture (WC-RG) and white

clover-fescue mixture (WC-FE). Nitrogen transfers were estimated using the difference method. For alfalfa, the variation in the number of plants was weighted for each date by the average taproot mass in the 0-25 cm soil layer

Discussion

Direct N transfer occurred from the two legume species but had different impacts on the nitrogen nutrition and yield of mixed grasses

Both the field and greenhouse experiments demonstrated significant impacts of forage legumes on the growth and N acquisition of companion grasses in grass-legume mixtures. In the field (Exp. 1), the grass NNI value was improved shortly after emergence and during the initial growth period with all grass-legume combinations. This NNI enhancement occurred prior to any significant N transfer, which was first detected during the second and

third regrowth periods in white clover-based mixtures, but only during the second year in alfalfa-based mixtures. Improved plant N concentrations in the absence of any additional N source could be explained by complementarity effects, and niche separation between grasses and legumes (Bedoussac and Justes 2010b). As a result of the different plant densities in pure and mixed stands, more soil N per plant was available to the dominant competitor for N in the mixture (i.e. grasses). This complementarity effect is usually the principal mechanism at work in mixtures of annuals that can explain changes in N acquisition (e.g. grain legumes-cereals; Corre-Hellou et al. 2006; Schipanski and Drinkwater 2012). We confirmed here that it was also of major

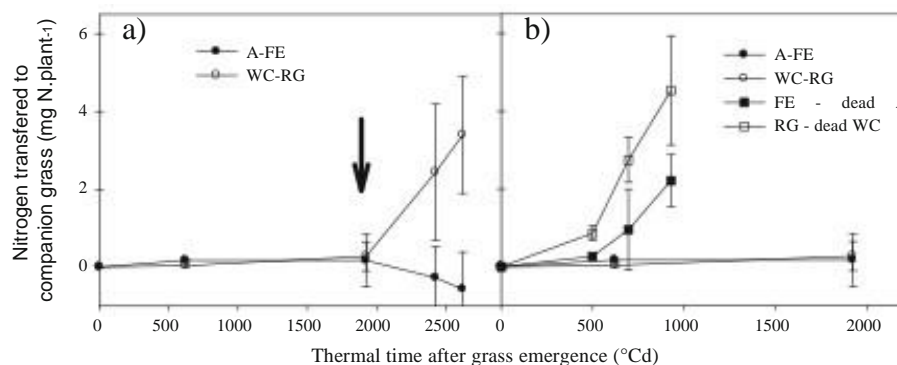


Fig. 8 Effects of (a) frequent defoliation of mixed legume and (b) root residues of recently severed legumes on the net nitrogen transferred to grass in Exp. 2. The four treatments were alfalfa-fescue mixture (A-FE), white clover-ryegrass mixture (WC-RG), pure tall fescue on a N-free medium supplemented with fresh root

mass of alfalfa (FE-dead A) and pure ryegrass on a N-free medium supplemented with the fresh root mass of white clover (RG-dead WC). The vertical arrow indicates the full-bloom stage of alfalfa and the beginning of the frequent defoliation regime for legumes. Vertical bars indicate standard deviations (N=4)

importance during the establishment phase of perennial mixtures.

However, unlike mixtures of annuals (Jamont et al. 2013), a significant net transfer of N from legume to grass was recorded later on. Although with different delays and rates, N transfer was found in all grass-legume combinations in the field (up to 72 and 43 kg N.ha⁻¹.y⁻¹ estimated by the isotopic method in WC-RG and A-FE, respectively). Such amounts and rates had previously been reported with white clover-based mixtures (Goodman and Collison 1986; Mallarino et al. 1990; Høgh-Jensen and Schjoerring 2000). More contrasted results have been reported in the literature for alfalfa mixtures, which are generally believed to release smaller amounts of N under field conditions. Most short-term experiments have quantified transfers of up to 10 kg N.ha⁻¹.y⁻¹ in alfalfa-based mixtures (<2 years; Ta and Faris 1987a; Hardarson et al. 1988), whereas longer term experiments have reported an increase over time to up to 19 kg N.ha⁻¹.y⁻¹ (>3 years; Burity et al. 1989; Tømm 1993). The yields and amounts of N fixed by mixed alfalfa were significantly lower in these previous long-term studies (up to 170–185 kg fixed N.ha⁻¹.y⁻¹, Burity et al. 1989; Tømm 1993) than in our work (up to 320 kg fixed N.ha⁻¹.y⁻¹), which may in part explain the difference in N cycling and N transfer.

The net N transfer to grass resulted in a significant impact on their N nutrition. The NNI of mixed grasses increased more markedly in situations where significant N transfers were recorded, indicating a supplemental effect rather than a mere niche separation effect. For instance, during the first year, NNI values rose more rapidly with white clover-based mixtures than with alfalfa, where significant transfer only occurred in the second year. In older stands, N transfer also resulted in a general improvement of the productivity (and N yield) of mixed grasses when compared to pure grass, but with a more limited rise in the NNI. The severe N stress observed in our study on pure grass controls (NNI < 0.5 in the absence of N fertilisation) was thus unambiguously reduced in mixtures because of both the complementarity of N resources in the first instance, and then gradual N transfer from legumes.

The positive effect of legumes on companion grasses went beyond direct N transfer and density effects

The “difference” method and “isotopic” method used to estimate net N transfer to mixed grasses yielded consistent but systematically different estimates. The

“isotopic” method predicted about 35 % less N transfer from legumes. However, the two methods had been expected to produce slightly different information (Chalk et al. 2014). The “difference” method reflects the N economy of the grass in the mixture when compared to a pure grass stand receiving the same N input, but without certifying that the supplemental N comes from legumes. It represents the actual N gain when legumes are introduced as an N source for non-fixing companion plants. Expressed on a land area basis, its values are not sensitive to potential niche separation effects related to plant density, but they are sensitive to potential in-depth changes in the N pool size (for instance, caused by modifications to vertical root distributions and the volume of soil explored). Even when considering an unchanged soil N pool size, modifications to soil biology and chemistry are likely to occur as a consequence of introducing legume N into the system. Experiments with an added N source have often shown that plants given supplemental N take up more N from the soil than those not given N - the so-called ‘priming effect’ (Jenkinson et al. 1985; Kuzyakov et al. 2000). A couple of other studies have reported such discrepancies between the supplemental N gained by mixed grasses and grass N actually derived from legumes, always in favour of the difference method (Ta and Faris 1987a; Tømm 1993; Chalk et al. 2014). In recent years, the vast majority of studies made reports on a single isotopic approach, or different isotopic methods (Ta and Faris 1987b; Burity et al. 1989; Mallarino et al. 1990; Heichel and Henjum 1991; Høgh-Jensen and Schjoerring 2000), without comparing with the N-difference method. From an N-provisioning perspective however, both direct legume N transfer and indirect N added effect are of importance (Jackson et al. 2008). More valuable information in terms of the services attached to legumes could be gained in future studies reporting and comparing both the difference and direct legume N transfer. Such studies could provide insights simultaneously on both aspects of the beneficial effects of legumes on companion crops.

Differences in N transfer dynamics between alfalfa and white clover were better explained by population dynamics, root traits and residue quality than by overall legume productivity and fixation

We found that the quantitative impacts of legume species on N transfer to companion grasses differed in

terms of both amounts and dynamics. Quite remarkably, the differences in productivity, atmospheric nitrogen fixation, the proportion of legume in the mixture or root allocation between alfalfa and white clover could not account for the difference in N transfer. Alfalfa was more than twice as effective as white clover regarding all these items during years two and three, but displayed a lower proportion of legume N in the mixed grass (30–40 % versus 60–70 % for alfalfa and white clover, respectively) and lower amounts of N transfer (59 versus 147 kg N.ha⁻¹ cumulated over three years, based on the isotopic method). When relating the amount of N transferred to grass to the amount of N₂ fixed (Fig. 9), white clover proved to be about five times better at exploiting fixed N in favour of the companion grass in the field (0.50 kg N.kg N⁻¹ as compared to 0.10 kg N.kg N⁻¹ for alfalfa). Similar conclusions could be drawn from the greenhouse experiment: although more than twice less abundant, clover root residues released N twice as quickly to grass after severing legumes to death. Such differences in N transfer capacity between species had already been recognised under controlled conditions (Ta and Faris 1987b) and during field trials for different ranges of legumes (Mallarino et al. 1990; Heichel and Henjum 1991), but were primarily associated with differences in legume productivity and legume proportion (Mallarino et al. 1990). By contrast, our results did not support such a direct quantitative hypothesis.

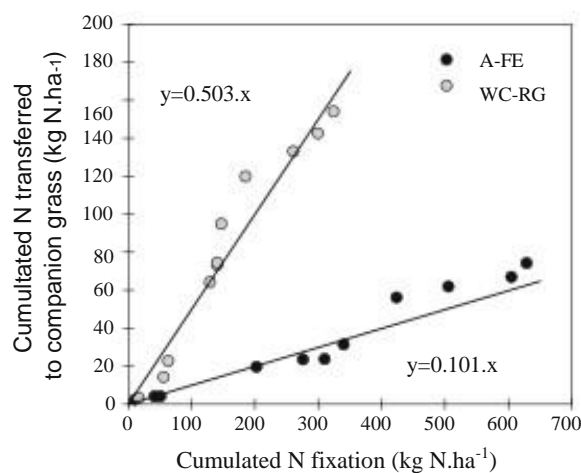


Fig. 9 Relationship between the amount of nitrogen fixed by the legume and the amount of nitrogen transferred to the companion grass for alfalfa-fescue mixture (A-FE) and white clover-ryegrass (WC-RG) mixtures. Nitrogen transfers were estimated using the isotopic method

In the context of hay production, the deposit of N in the soil by legumes during their growth mainly arises from root activity and root and nodule residues (Dubach and Russelle 1994; Brophy and Heichel 1989; Fustec et al. 2010). Alfalfa and white clover displayed highly contrasting population dynamics in Exp. 1, with alfalfa presenting a regular decrease in density over the whole experiment, while clover displayed a strong intra-year pattern (expanding in the spring and receding in the summer). As a result, alfalfa and white clover developed two opposing strategies with respect to root growth and long term survival: on the one hand, alfalfa invested mainly in perennial structures (large taproot with high soluble content), whereas white clover maintained or renewed a large proportion of fine nodal roots with no signs of secondary growth. Nitrogen transfer was quantitatively related to recent decreases in the legume population for both species. But as the patterns and magnitude of variations in the legume population differed, so did the N transfers between species. This finding suggests that the death of whole plants, or of rooted plant modules (in the case of a clonal plant such as white clover, Forde et al. 1989), might contribute significantly to N rhizodeposition in perennial legumes. The tissue turnover of living plants may also differ. Indeed, the root traits (secondary thickening, lignin content and soluble content) suggested possible differences in the tissue life span of fine roots and nodules, which was potentially shorter in white clover (Ryser 1996; Aulen et al. 2012). In line with this hypothesis, our results under controlled conditions (Exp. 2) demonstrated a rapid N release from roots in response to frequent defoliation in the case of WC-RG but not in the case of A-FE (see also Butler et al. 1959; Simpson 1965).

Moreover, tissue composition, as represented by the N content, fibre content and C/N ratio, also suggested that the root residues of white clover may decompose more rapidly than those of alfalfa once released. The proportion of N-rich root tissues (fine roots and nodules) remained high in white clover, and the C/N ratio (13.9) remained significantly below the threshold of 20 that causes a net mineralization of residues (Wedin and Tilman 1990; Fox et al. 1990; Cadisch et al. 1998). By contrast, the proportion of fine roots became marginal and the C/N ratio increased with time in alfalfa's most decomposable fraction (up to 19.3). In addition to root traits, the difference of growth habit between the two species is also likely to favour larger quantities of shoot residues (stems and petioles) from white clover than alfalfa (Forde et al. 1989), a factor that was not properly

quantified during this study. Such qualitative differences of plant residues have been shown to affect the residual effect that legumes exert on the next crop in a rotation, and to overwhelm the direct effect of the quantity of residues in the next spring (Rasmussen et al. 2012). Our findings suggest that tissue composition and residue quality also matter to determine N transfer rates to companion grasses. In addition to the quantitative aspects of rhizodeposition already discussed, the delayed transfer observed in alfalfa-based mixtures could result from partly immobilized legume N because of poorer residue quality (>95 % of roots in the taproot with C/N > 26 in three year old stands).

Finally, although differences in the excretion of N-rich soluble compounds cannot be excluded (Paynel and Cliquet 2003; Lesuffleur et al. 2013), such differences were not detected during Exp. 2. No significant supplemental N was captured by mixed grasses growing with alfalfa or white clover in an N-free medium during the establishment period, prior to frequent legume defoliation (Fig. 8a). Similarly, during the initial growth period in the field, grass NNI values increased with both legume species not as a result of N transfer, but mainly because of resource complementarity. Significant N transfers occurred later, with a longer delay for alfalfa (about a year) than for clover (apparent from the second regrowth). Our results therefore suggest that legume material turnover and decay play a prominent role in the long-term establishment of N transfer in grasslands, and that legume species differ in terms of the rate, form and quality of their residues, ultimately altering N cycling. In addition to yield potential and nitrogen fixation, the traits involved in determining the ability to recover from important stresses and to sustain legume abundance fluctuations could be central to explaining N transfer capacity in perennial legumes.

Acknowledgments This study was supported by the E & A department of INRA (TransfertN project) and the CAPES/Cofecub exchange programme from Brazil (project 684/10). We would like to thank S. Carre, A. Eprinchard, L. Faverjon, N. Moynet, A. Philiponneau, E. Rivault and J.P. Terrasson for their assistance with the experiments.

References

- Altieri MA (1999) Applying agro-ecology to enhance productivity of peasant farming systems in Latin America. *Environ Dev Sustain* 1:197-217
- Aulen M, Shipley B, Bradley R (2012) Prediction of in situ root decomposition rates in an interspecific context from chemical and morphological traits. *Ann Bot* 109(1):287-297
- Bedoussac L, Justes E (2010a) The efficiency of a durum wheat-winter pea intercrop to improve yield and wheat grain protein concentration depends on N availability during early growth. *Plant Soil* 330:19-35
- Bedoussac L, Justes E (2010b) Dynamic analysis of competition and complementarity for light and N use to understand the yield and the protein content of a durum wheat-winter pea intercrop. *Plant Soil* 330:37-54
- Bethlenfalvai GJ, Reyes-Solis MG, Camel SB, Ferrera-Cerrato R (1991) Nutrient transfer between the root zones of soybean and maize plants connected by a common mycorrhizal mycelium. *Physiol Plant* 82(3):423-432
- Birouste M, Kazakou E, Blanchard A, Roumet C (2012) Plant traits and decomposition: are the relationships for roots comparable to those for leaves? *Ann Bot* 109:463-472
- Brophy LS, Heichel GH (1989) Nitrogen release from roots of alfalfa and soybean grown in sand culture. *Plant Soil* 116:77-84
- Burley HA, Ta TC, Faris MA, Coulman BE (1989) Estimation of nitrogen fixation and transfer from alfalfa to associated grasses in mixed swards under field conditions. *Plant Soil* 114:249-255
- Butler GW, Greenwood RM, Soper K (1959) Effects of shading and defoliation on the turnover of root and nodule tissue of plants of *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, and *Lotus uliginosus*. *N Z J Agric Res* 2(3):415-426
- Cadisch G, Handayanto E, Malama C, Seyni F, Giller KE (1998) N recovery from legume prunings and priming effects are governed by the residue quality. *Plant Soil* 205:125-134
- Carlsson G, Huss-Danell K (2003) Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant Soil* 253:353-372
- Chabbi A, Kögel-Knabner I, Rumpel C (2009) Stabilised carbon in subsoil horizons is located in spatially distinct parts of the soil profile. *Soil Biol Biochem* 41:256-261
- Chalk PM, Peoples MB, McNeill AM, Boddey RM, Unkovich MJ, Gardener MJ, Silva CF, Chen D (2014) Methodologies for estimating nitrogen transfer between legumes and companion species in agro-ecosystems: a review of ^{15}N -enriched techniques. *Soil Biol Biochem* 73:10-21
- Corre-Hellou G, Fustec J, Crozat Y (2006) Interspecific competition for soil N and its interactions with N_2 fixation, leaf expansion and crop growth in pea-barley intercrops. *Plant Soil* 282:195-208
- Dabney SM, Delgado JA, Reeves DW (2001) Using cover crops to improve soil and water quality. *Commun Soil Sci Plant Anal* 32(7&8):1221-1250
- Drinkwater LE, Wagoner P, Sarrantonio M (1998) Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. *Nature* 396:262-265
- Dubach M, Russelle MP (1994) Forage legume roots and nodules and their role in nitrogen transfer. *Agron J* 86:259-266
- Ehrmann J, Ritz K (2014) Plant: soil interactions in temperate multi-cropping production systems. *Plant Soil* 376:1-29
- Elgersma A, Hassink J (1997) Effects of white clover (*Trifolium repens* L.) on plant and soil nitrogen and soil organic matter in mixtures with perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Soil* 197:177-186

- Erisman JW, Galloway JN, Seitzinger S, Bleeker A, Dise NB, Petrescu AMR, Leach AM, de Vries W (2013) Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Phil Trans R Soc B* 368:20130116
- Finn JA, Kirwan L, Connolly J, Sebastià MT, Helgadóttir Á et al (2013) Ecosystem function enhanced by combining four functional types of plant species in intensively managed grassland mixtures: a 3-yr continental-scale field experiments. *J Appl Ecol* 50:365-375
- Forde MB, Hay MJM, Brock JL (1989) Development and growth characteristics of temperate perennial legumes. In: Marten GC et al (eds) Persistence of forage legumes. American Society of Agronomy, Honolulu, pp 91-110
- Fort F (2013) Stratégies d'acquisition des ressources des plantes prairiales sous contraintes hydrique et minérale - Rôle du système racinaire dans la réponse aux facteurs structurant les communautés. Université de Toulouse, France
- Fox RH, Myers RJK, Vallis I (1990) The nitrogen mineralization rate of legume residues in soil as influenced by their polyphenol, lignin, and nitrogen contents. *Plant Soil* 129(2):251-259
- Fustec J, Lesuffleur F, Mahieu S, Cliquet J-B (2010) Nitrogen rhizodeposition of legumes. a review. *Agron Sustain Dev* 30: 57-66
- Gaba et al. (2015) Multiple cropping systems as drivers for providing multiple ecosystem services: from concepts to design. *Agron Sustain Dev*. doi:10.1007/s13593-014-0272-z
- Galloway JN, Aber JD, Erisman JW, Seitzinger SP, Howarth RW, Cowling EB, Cosby EJ (2003) The nitrogen cascade. *Bioscience* 53(4):341-356
- Gastal F, Lemaire G, Durand JL, Louarn G (2014) Quantifying crop responses to nitrogen and avenues to improve nitrogen-use efficiency. In: Sadras VO, Calderini D (eds) Crop physiology - Applications for genetic improvement and agronomy, 2nd edn. Academic, Elsevier, pp 161-206
- Goodman PJ, Collison M (1986) Effect of three clover varieties on growth, ¹⁵N uptake and fixation by ryegrass/white clover mixtures at three sites in Wales. *Grass Forage Sci* 41(3): 191-198
- Gruber N, Galloway JN (2008) An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451(7176):293-296
- Hardarson G, Zapata F, Danso SKA (1988) Dinitrogen fixation measurements in alfalfa-ryegrass swards using Nitrogen-15 and influence of the reference crop. *Crop Sci* 28(1):101-105
- Heichel GH, Henjum KI (1991) Dinitrogen fixation, nitrogen transfer, and productivity of forage legume-grass communities. *Crop Sci* 31(1):202-208
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311:1-18
- Høgh-Jensen H, Schjoerring JK (2000) Below-ground nitrogen transfer between different grassland species: Direct quantification by ¹⁵N leaf feeding compared with indirect dilution of soil ¹⁵N. *Plant Soil* 227:171-183
- Høgh-Jensen H, Loges R, Jørgensen FV, Vinther FP, Jensen ES (2004) An empirical model for quantification of symbiotic nitrogen fixation in grass-clover mixtures. *Agric Syst* 82: 181-194
- Hopkins A, Wilkins RJ (2006) Temperate grassland: key developments in the last century and future perspectives. *J Agric Sci* 144(06):503-523
- IUSS Working Group WRB (2006) World reference base for soil resources 2006. World Soil Resources Report No. 103. FAO, Rome
- Jackson LE, Burger M, Cavagnaro TR (2008) Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 59(1):341-363
- Jamont M, Piva G, Fustec J (2013) Sharing N resources in the early growth of rapeseed intercropped with faba bean: does N transfer matter? *Plant Soil* 371:641-653
- Jenkinson DS, Fox RH, Rayner JH (1985) Interactions between fertilizer nitrogen and soil nitrogen: the so-called 'priming' effect. *J Soil Sci* 36(3):425-444
- Jensen LS, Schjoerring JK (2011) Benefits of nitrogen for food, fibre and industrial production. In: Sutton MA et al (eds) The European nitrogen assessment. Sources, effects and policy perspectives. Cambridge University Press, Cambridge, pp 32-61
- Kuzyakov Y, Friedel JK, Stahr K (2000) Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol Biochem* 32: 1485-1498
- Ledgard SF, Steele KW (1992) Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant Soil* 141(1):137-153
- Lesuffleur F, Salon C, Cliquet JB (2013) Use of a ¹⁵N₂ labelling technique to estimate exudation by white clover and transfer to companion ryegrass of symbiotically fixed N. *Plant Soil* 369(1-2):187-197
- Lithourgidis AS, Dordas CA, Damalas CA, Vlachostergios DN (2011) Annual intercrops: an alternative pathway for sustainable agriculture. *Aust J Crop Sci* 5:396-410
- Louarn G, Corre-Hellou G, Fustec J, Lô-Pelzer E, Julier B, Litrico I, Hinsinger P, Lecomte C (2010) Déterminants écologiques et physiologiques de la productivité et de la stabilité des associations graminées-légumineuses. *Innov Agron* 11:79-99
- Mallarino AP, Wedin WF, Perdomo CH, Goyenola RS, West CP (1990) Nitrogen transfer from white clover, red clover, and birdsfoot trefoil to associated grass. *Agron J* 82(4):790-795
- Marriot C, Haystead A (1993) Nitrogen fixation and transfer. In: Davies A, Baker RD, Grant SA, Laidlaw A (eds) Sward measurement handbook. reading. The British Grassland Society, UK, pp 245-264
- Nyfelér D, Huguenin-Elie O, Suter M, Frossard E, Lüscher A (2011) Grass-legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agric Ecosyst Environ* 140(1-2):155-163
- Paynel F, Cliquet JB (2003) N transfer from white clover to perennial ryegrass, via exudation of nitrogenous compounds. *Agronomie* 23(5-6):503-510
- Peoples MB, Brockwell J et al (2009) The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* 48:1-17
- Rasmussen J, Sørensen K, Pirhofer-Walzl K, Eriksen J (2012) N₂-fixation and residual N effect of four legume species and four companion grass species. *Eur J Agron* 36(1):66-74
- Ryser P (1996) The importance of tissue density for growth and life span of leaves and roots: a comparison of five ecologically contrasting grasses. *Funct Ecol* 10:717-723
- Schipanski M, Drinkwater L (2012) Nitrogen fixation in annual and perennial legume-grass mixtures across a fertility gradient. *Plant Soil* 357:147-159
- Simpson J (1965) The transference of nitrogen from pasture legumes to an associated grass under several systems

- of management in pot culture. *Aust J Agric Res* 16(6): 915-926
- Simpson J (1976) Transfer of nitrogen from three pasture legumes under periodic defoliation in a field environment. *Aus J Exp Agric Anim Husb* 16(83):863-870
- Snapp SS, Swinton SM, Labarta R, Mutch D, Black JR, Leep R, Nyiraneza J, O'Neil K (2005) Evaluating cover crops for BENEFITS, costs and performance within cropping system niches. *Agron J* 97(1):322-332
- Ta TC, MacDowall FDH, Faris MA (1986) Excretion of nitrogen assimilated from N₂ fixed by nodulated roots of alfalfa (*Medicago sativa*). *Can J Bot* 64:2063-2067
- Ta TC, Faris MA (1987a) Effects of alfalfa proportions and clipping frequencies on timothy-alfalfa mixtures. II. Nitrogen fixation and transfer. *Agron J* 79:820-824
- Ta TC, Faris MA (1987b) Species variation in the fixation and transfer of nitrogen from legumes to associated grasses. *Plant Soil* 98:265-274
- Tomm G (1993) Nitrogen transfer in an Alfalfa-Brome grass mixture. University of Saskatchewan, Saskatoon
- Unkovitch M, Herridge D, Peoples M, Cadisch G, Boddey B, Giller K, Alves B, Chalk PM (2008) Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. ACIAR, Canberra
- Van Soest PJ (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J Assoc Off Anal Chem* 46:829-835
- Walker TW, Orchiston HD, Adams AFR (1954) The nitrogen economy of grass legume associations. *Grass Forage Sci* 9(4):249-274
- Wardle DA, Greenfield LG (1991) Release of mineral nitrogen from plant root nodules. *Soil Biol Biochem* 23(9):827-832
- Wedin D, Tilman D (1990) Species effects on nitrogen cycling: a test with perennial grasses. *Oecologia* 84: 433-441

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sobre produção vegetal em sistemas integrados, algumas considerações são relatadas. Com os resultados observados nesta pesquisa, considera-se a importância da adubação nitrogenada para garantir a produtividade tanto de massa seca de pastagem como, conseqüentemente, a produtividade de grãos na cultura seguinte. Resultados de experimentos anteriores na mesma área e também outras pesquisas realizadas no sub-tropico brasileiro, evidenciam que o pastejo não interfere negativamente nas condições do solo a ponto de prejudicar a produtividade de grãos, contribui para a ciclagem do nitrogênio além de adicionar renda ao produtor, com a produção de carne ou leite. Por esses motivos, essa pesquisa trabalhou apenas com as áreas que foram pastejadas pelos ovinos.

Existem ainda questões a serem trabalhadas, como o sistema de pastejo, se rotacionado, contínuo ou rotatínuo, e um melhor entendimento da dinâmica da biomassa microbiana do solo nos processos de mineralização e imobilização. Nesse sentido, fazem-se necessários ainda, experimentos de longa duração para avaliar o melhor momento de se fazer uma adubação nitrogenada quando se pensa em produção do sistema. Para isso, novas pesquisas devem ser desenvolvidas em continuidade.

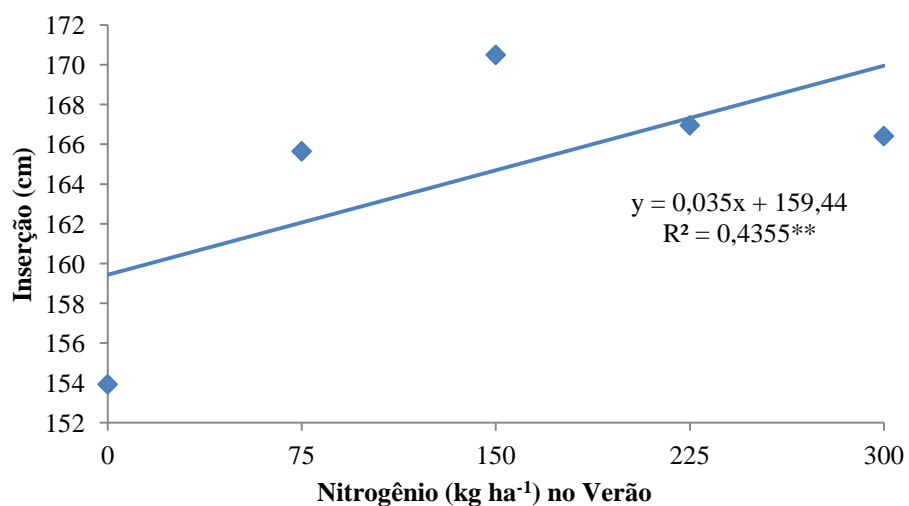
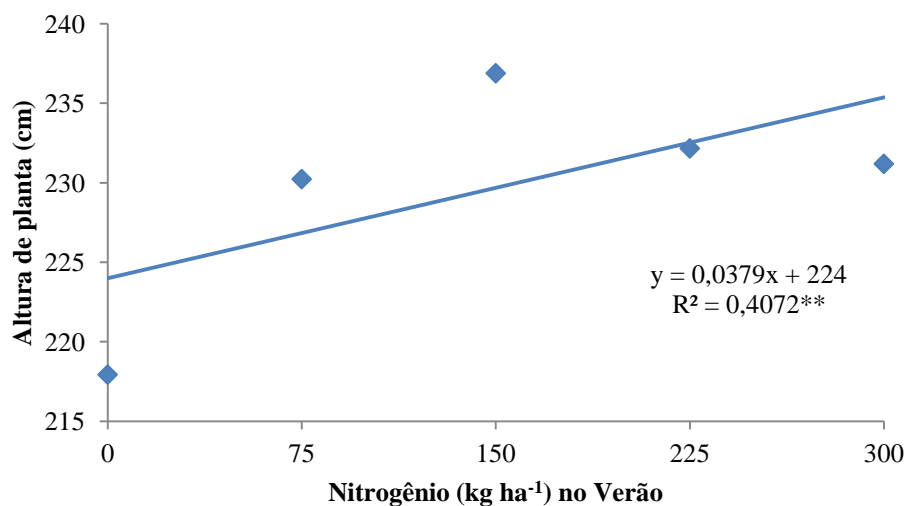
6. ANEXOS

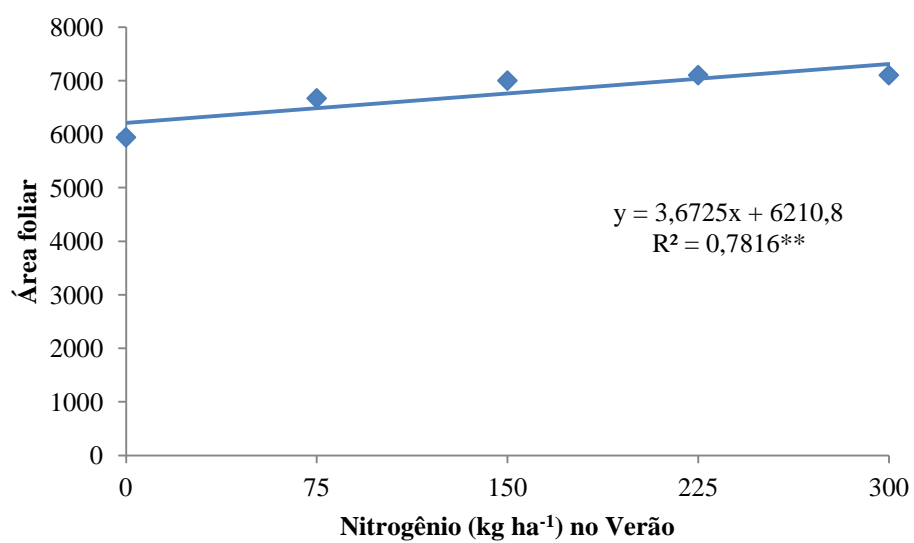
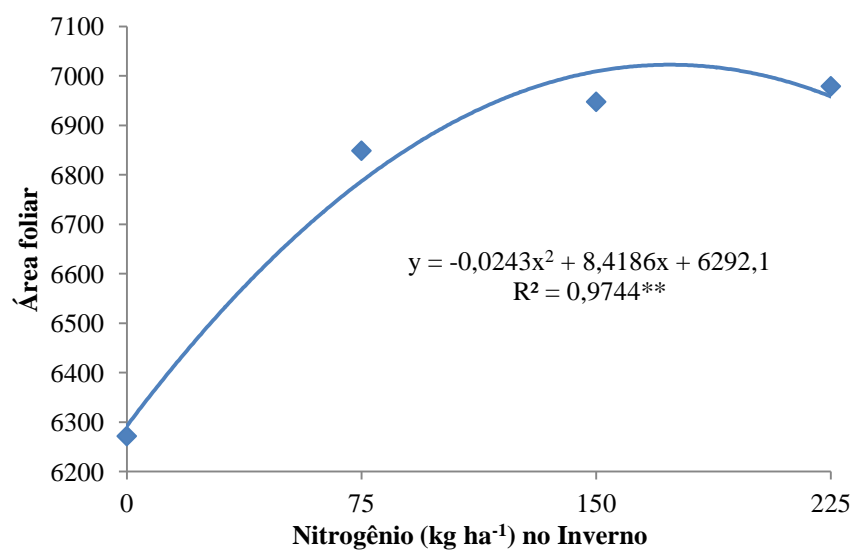
ANEXO 1 - Resumo da análise de variância indicando os fatores de variação, graus de liberdade (GL), quadrados médios e significância (F) para as variáveis avaliadas na cultura do milho. Guarapuava, PR, 2012.

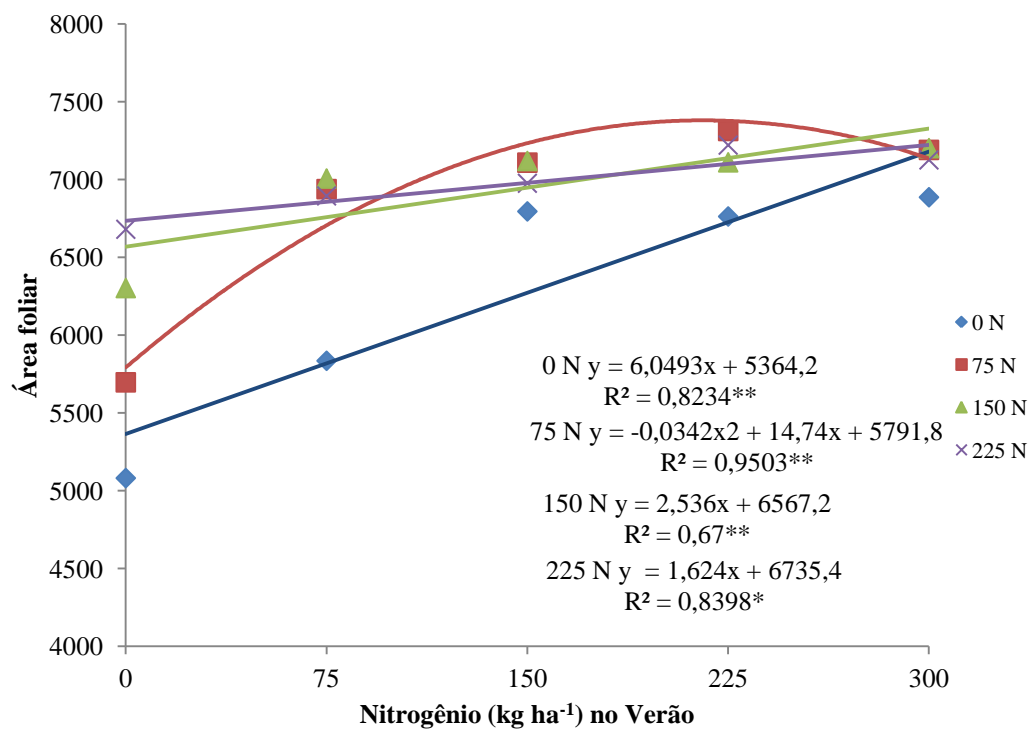
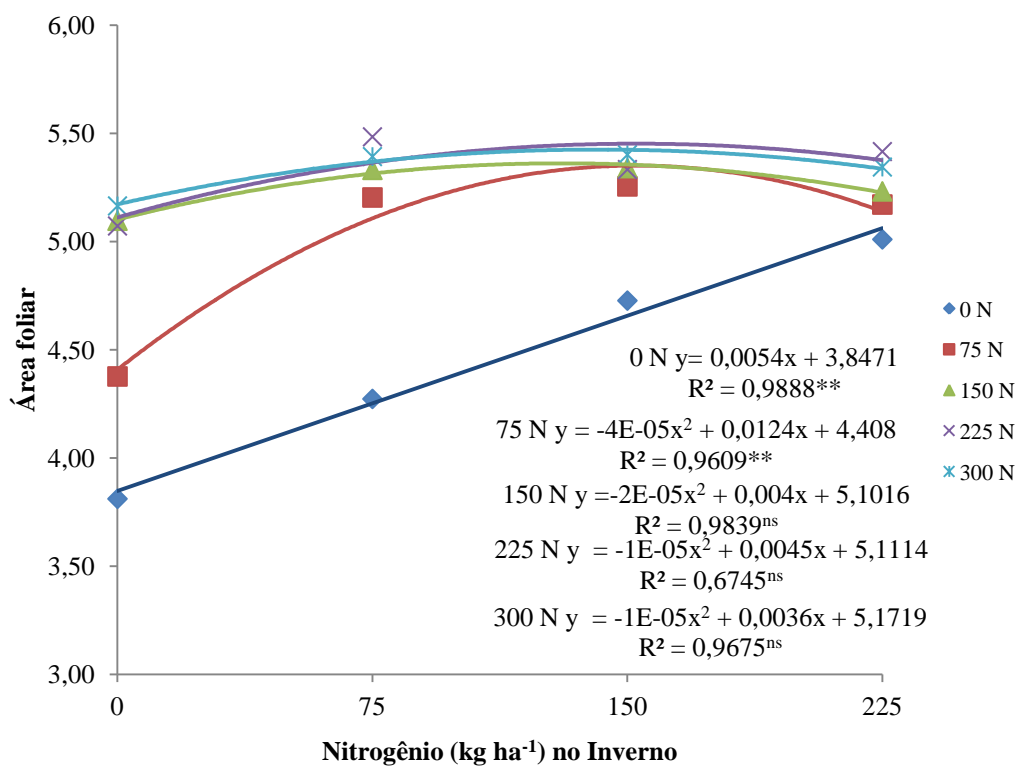
FV	GL	QM						
		PL	EP	AP	A	INS	AF	IAF
Bloco	2	10997129 ^{ns}	0,004 ^{ns}	373,55 ^{ns}	1,08 ^{ns}	518,53 ^{ns}	92014 ^{ns}	0,02 ^{ns}
I	3	56560251 ^{ns}	0,005 ^{ns}	257,00 ^{ns}	0,77 ^{ns}	187,48 ^{ns}	32955153 ^{**}	2,11 ^{**}
Resíduo (a)	6	11671165	0,005	961,95	1,58	611,15	203617	0,16
CV a (%)		1,43	2,30	4,30	27,41	4,74	2,11	2,50
Parcelas	11							
V	4	32677141 ^{ns}	0,001 ^{ns}	1634,57 [*]	2,57 ^{ns}	950,93 ^{**}	5824048 ^{**}	3,31 ^{**}
V x I	12	17344085 ^{ns}	0,002 ^{ns}	547,73 ^{ns}	2,51 ^{ns}	108,06 [*]	533605 [*]	0,35 ^{**}
Resíduo (b)	32	12631945	0,002	559,00	1,19	38,92	143684	0,08
CV b (%)		3,34	3,34	7,34	53,15	2,67	3,96	4,00
Subparcelas	59							
PS	1	1057605312 ^{**}	0,125 ^{**}	2750,99 [*]	0,09 ^{ns}	800,83 ^{**}	1155814 [*]	0,80 ^{**}
PS x V	4	2296950 ^{ns}	0,000 ^{ns}	416,86 ^{ns}	4,67 ^{ns}	26,60 ^{ns}	571322 [*]	0,33 [*]
PS x I	3	13536855 ^{ns}	0,002 ^{ns}	448,03 ^{ns}	1,36 ^{ns}	104,45 ^{ns}	634723 [*]	0,46 [*]
PS x V x I	12	7843771 ^{ns}	0,001 ^{ns}	580,02 ^{ns}	1,48 ^{ns}	32,30 ^{ns}	184392 ^{ns}	0,13 ^{ns}
Resíduo (c)	40	11900092	0,002	523,59	2,27	51,39	205952	0,10
CV c (%)		4,58	4,91	10,05	103,69	4,35	6,71	6,54
Total	119							
Média		75191	1,05	227,62	1,45	164,66	6761,65	5,06

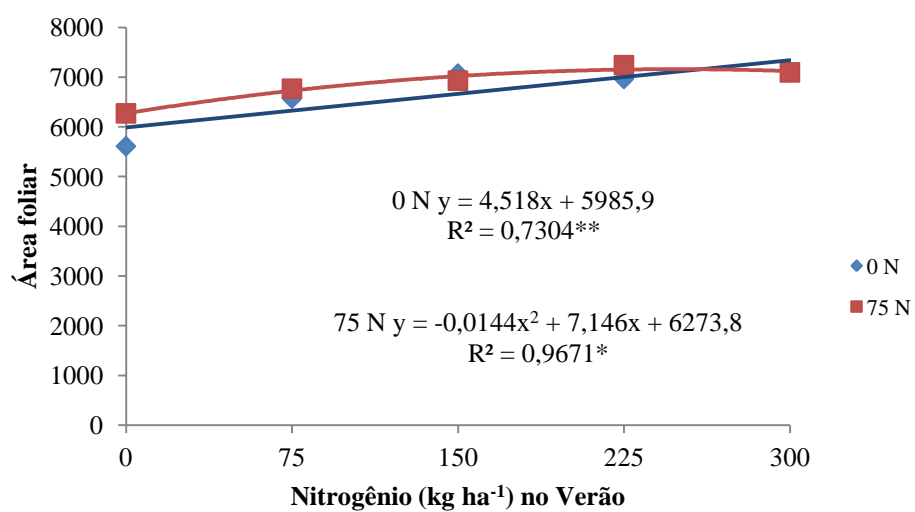
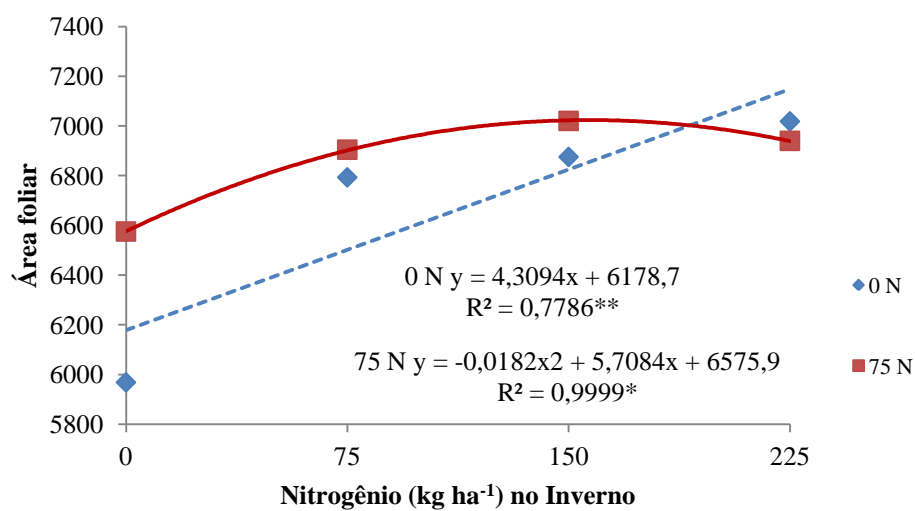
FV – Fontes de variação; CV - Coeficiente de variação; Inverno (I); Verão (V); Pré-semeadura (PS); Número de plantas (PL); Número de espigas por planta (EP); Altura de planta (AP); Grãos ardidos (A); Altura de inserção da espiga (INS); Área foliar (AF); Índice de área foliar (IAF). ns – não significativo; * p<0.05; ** p<0.01 de probabilidade pelo Teste F.

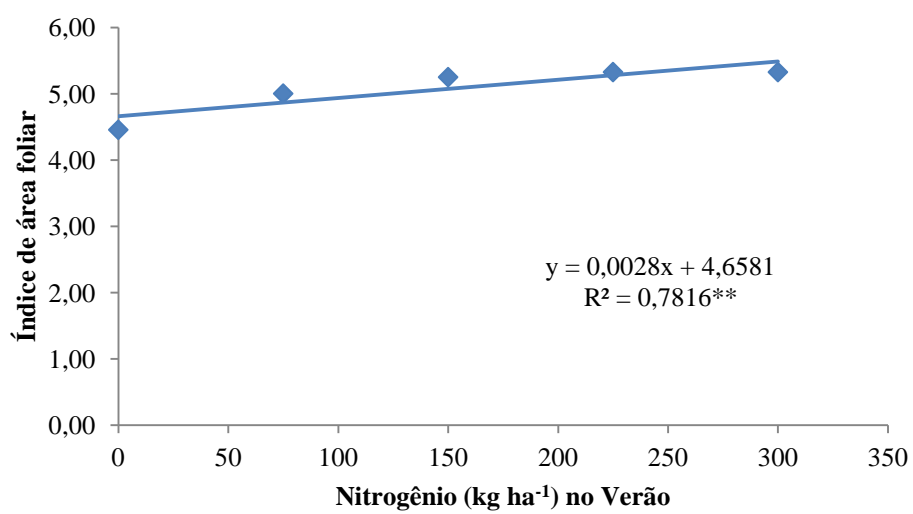
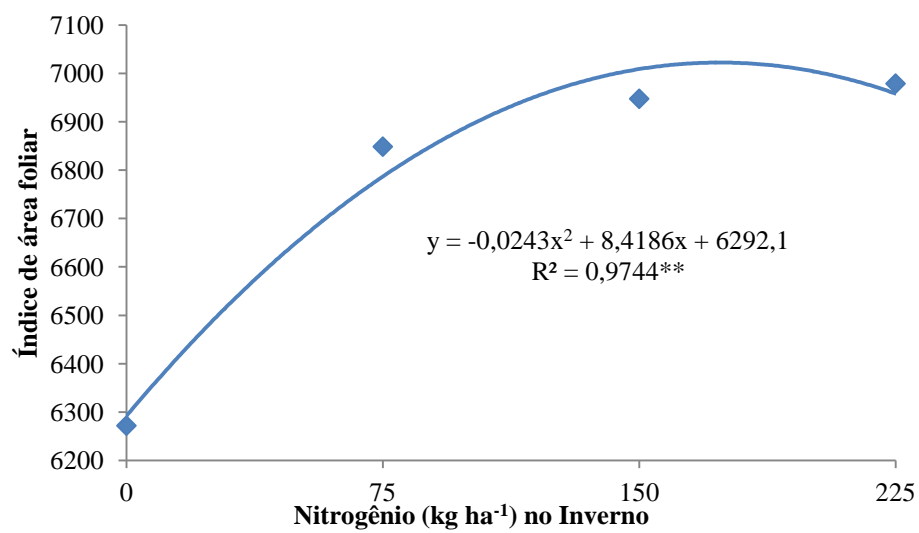
ANEXO 2 – Análises de regressão referentes às características agronômicas: Número de plantas; Número de espigas por planta; Altura de planta; Grãos ardidos; Altura de inserção da espiga; Área foliar; Índice de área foliar.

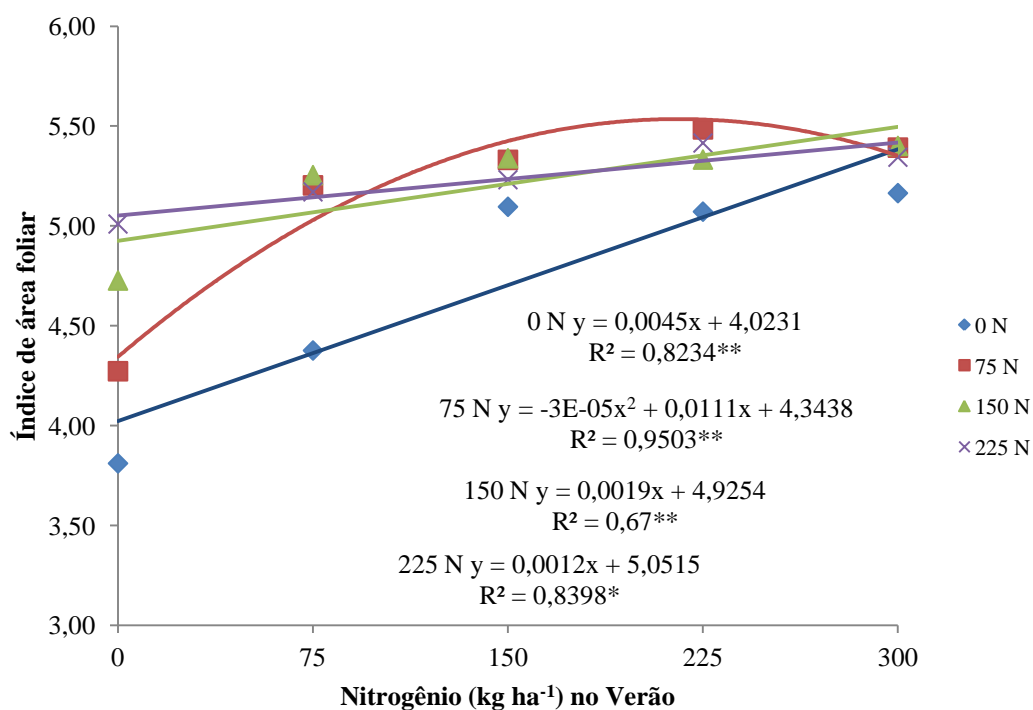
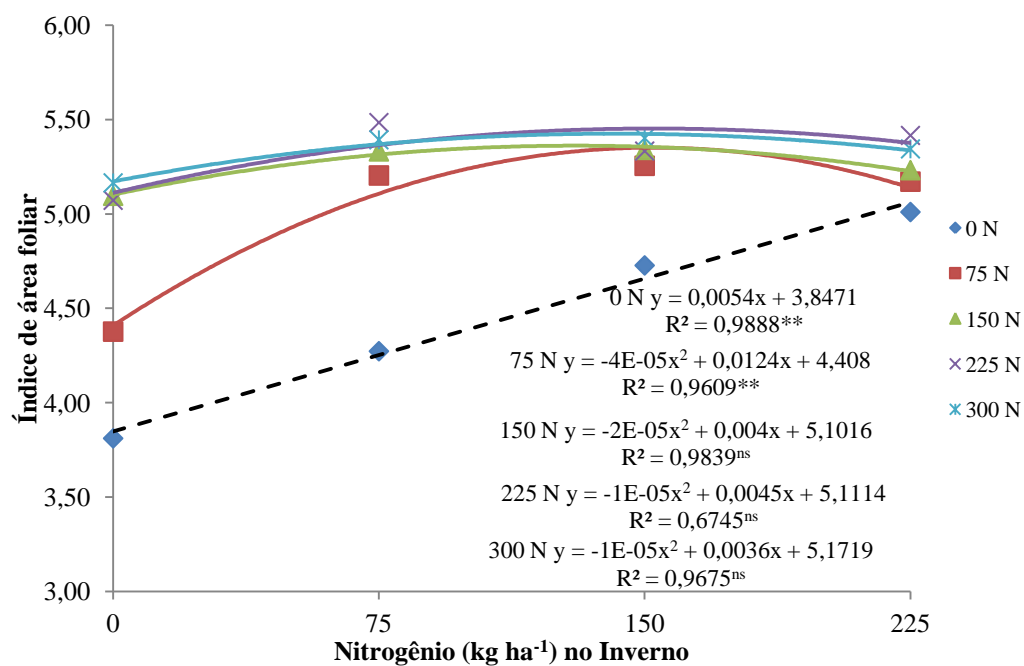


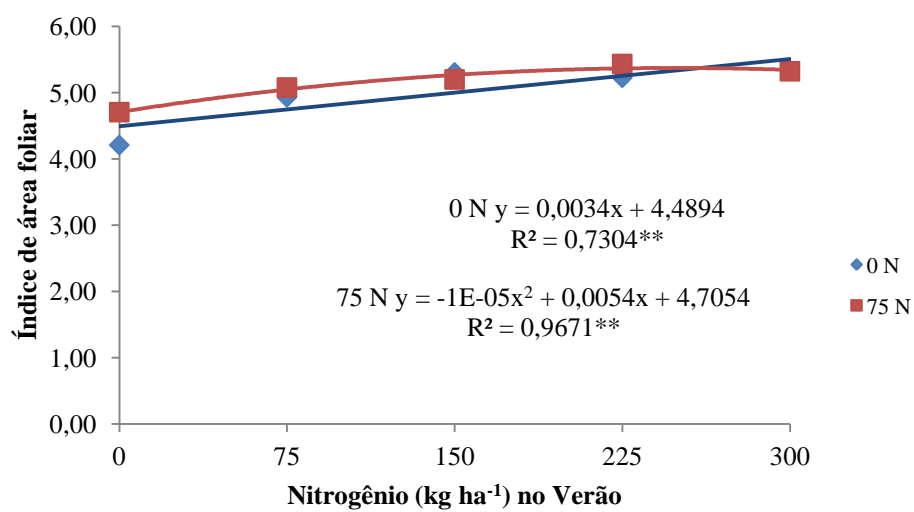
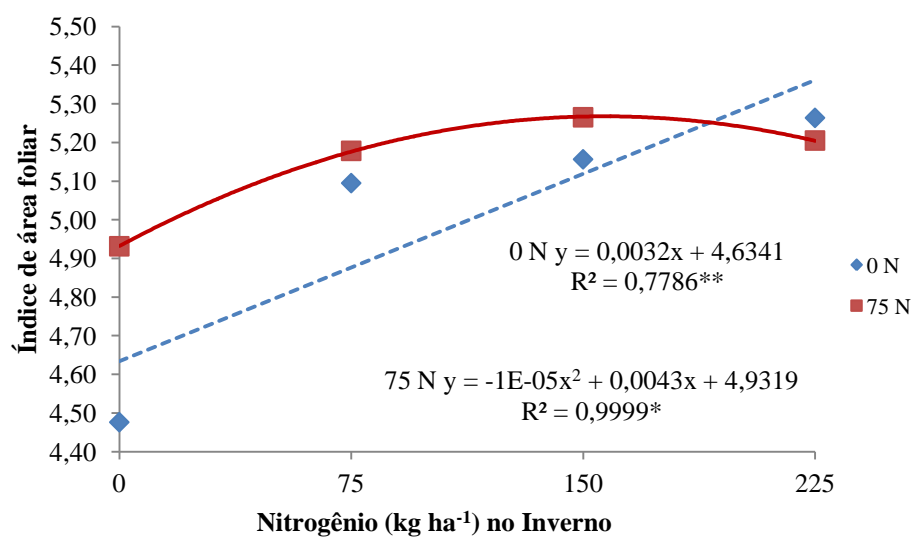












ANEXO 3 – Análises de regressão referentes às interações dos fatores Inverno, Pré-semeadura e Verão. Figuras “A” 0 kg ha⁻¹ N em Pré-semeadura; Figuras “B” com 75 e 0 kg ha⁻¹ N em Pré-semeadura.

